



GISELLY MOTA DA SILVA

**ADUBAÇÃO ORGÂNICA, MICROPROPAGAÇÃO E
VALIDAÇÃO ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE
CARDENOLÍDEOS TOTAIS EM *Digitalis purpurea* subsp.
*heywoodii***

**LAVRAS-MG
2017**

GISELLY MOTA DA SILVA

**ADUBAÇÃO ORGÂNICA, MICROPROPAGAÇÃO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA
PARA DOSEAMENTO DE CARDENOLÍDEOS TOTAIS EM *Digitalis purpurea* subsp.
*heywoodii***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Coorientador

**LAVRAS-MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Giselly Mota da.

Adubação orgânica, micropropagação e validação analítica para doseamento de cardenólídeos totais em *Digitalis purpúrea* subs. *heywoodii* / Giselly Mota da Silva. - 2017.

105 p. : il.

Orientadora: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Coorientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Espectrofotometria no UV. 2. Citocininas. 3. LEDs. 4. Compostos digitálicos. I. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. II. Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. III. Título.

GISELLY MOTA DA SILVA

**ADUBAÇÃO ORGÂNICA, MICROPROPAGAÇÃO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA
PARA DOSEAMENTO DE CARDENOLÍDEOS TOTAIS EM *Digitalis purpurea* subs.
*heywoodii***

**ORGANIC FERTILIZATION, MICROPROPAGATION AND ANALYTICAL
VALIDATION FOR DETERMINATION OF TOTAL CARDENOLIDES IN *Digitalis*
purpurea subs. *heywoodii***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de março de 2017.

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto	UFLA
Dr. Fernão Castro Braga	UFMG
Dr. Rodrigo Maia de Pádua	UFMG
Dra. Ana Cristina da Silva Figueiredo	FFCUL

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

**LAVRAS-MG
2017**

Á minha família, por todo carinho e apoio em todos os momentos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos, não desanimar com as dificuldades e me ter dado forças para o desenvolvimento de meu trabalho;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão de bolsas de estudos e auxílio financeiro nos experimentos;

À professora Suzan Kelly Vilela Bertolucci, pela orientação, disponibilidade, atenção, paciência, dedicação, profissionalismo e pelos conhecimentos transmitidos, não tenho palavras para agradecer todo seu esforço para que tudo desse certo;

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, que para mim foi além de coorientador, agradeço pelo total apoio, o saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, que muito colaboraram para meu aprendizado;

Ao Professor Fernão (UFMG) e ao Allyui pela contribuição na realização do trabalho;

Aos amigos do laboratório, e principalmente ao Wesley e o Heitor, pelo grande apoio nas atividades;

Aos funcionários do Laboratório Evaldo, “seu” Dico”, “seu” Paulo e a Anette, pela fundamental ajuda no desenvolvimento dos experimentos;

Às minhas amigas, em particular Alline, Mayara e Tainá pelo apoio e amizade;

E em especial a minha querida família, meus pais e meus irmãos, principal motivo de tudo que faço, e por entenderem as minhas faltas e momentos de afastamento e reclusão, principalmente meus pais que me mostraram o quanto era importante estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade, a vocês eu tenho todo o agradecimento pelo esforço dedicado à minha formação pessoal e profissional.

RESUMO GERAL

Digitalis purpurea subsp. *heywoodii* (Plantaginaceae) é considerada uma espécie medicinalmente importante devido a presença do cardenolideo glicoevatromonosídeo, responsável por seu potencial antiviral ao herpes humano. Seu cultivo em campo apresenta alguns entraves, e como alternativas para esta problemática têm-se a adubação orgânica e o cultivo *in vitro*. Assim, objetivou-se cultivar a espécie *D. purpurea* subsp. *heywoodii* em vasos com diferentes doses de adubação orgânica e *in vitro* sob influência de fatores físicos e químicos, e avaliar seus efeitos no crescimento e teor de cardenolídeos totais. O método de quantificação de cardenolídeos totais por espectrofotometria no UV foi validado, o qual se mostrou seletivo a 494 nm, por não ter apresentado absorção significativa em solução de leitura sem adição do reagente de coloração, sendo linear na faixa de 0,025 a 0,125 mg/mL, $R^2=0,9994$. Apresentou também precisão inter-dia (DPR = 3,26%) e intra-dia (DPR = 3,58%), sendo considerado exato em concentrações baixas a média do intervalo linear (98,4% e 98,9%) e robusto para o tempo de reação de 25 min e frente a pequenas variações no comprimento de onda de leitura. A adubação orgânica avaliada foi o esterco de galinha. As doses desse esterco que melhor proporcionaram número e ganho de biomassa foliar foram as de 6 e 9 kg m⁻². A ausência de adubo proporcionou melhores ganhos de biomassa da raiz, maior relação R/PA e maiores teores médios de cardenolídeos. No entanto, a produtividade de cardenolídeos foram superiores na dose de 6 kg m⁻². Para os fatores químicos, utilizou-se diferentes concentrações e combinações das citocininas BAP e TDZ (mg L⁻¹), com total de treze tratamentos. O maior número de brotos ocorreu nas combinações de BAP + TDZ de 0,5+0,5; 0,25+0,75 e 1+0,5 mg L⁻¹. O acúmulo médio de biomassa seca e produtividade de cardenolídeos totais foi favorecido com a combinação de 0,375+0,125 mg L⁻¹. Avaliou-se também o efeito de fatores físicos como a intensidade, qualidade e o choque de luz. Intensidade e choque de luz com 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produziram maior biomassa da parte aérea, raiz e total, e maior teor e produtividade de cardenolídeos totais. LEDs azul favoreceram tanto a produção de biomassa da parte área quanto a produtividade de cardenolídeos totais. Portanto, o método mostrou-se linear, preciso, exato, robusto, seletivo e reprodutível, e com facilidade de execução; a aplicação de 6 kg m⁻² de esterco de galinha no cultivo *in vitro*; a combinação de 0,375+0,125 mg L⁻¹ de BAP + TDZ suplementado ao meio de cultura MS, intensidade e choque de luz com 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e LED azul no cultivo *in vitro* proporcionam boas condições para o cultivo da espécie, com incrementos na produção de biomassa e na produtividade de cardenolídeos totais.

Palavras-chave: Espectrofotometria no UV. Citocininas. LEDs, compostos digitálicos.

ABSTRACT

Digitalis purpurea subsp. *heywoodii* (Plantaginaceae) is considered a medicinally important species due to the presence of glycoevatomonoside cardenolide, responsible for its antiviral potential for human herpes. Its field cultivation presents a few obstacles, demanding the use of organic fertilization and *in vitro* cultivation as alternative for this issue. Thus, the objective was to cultivate the *D. purpurea* subsp. *heywoodii* species in pots with different doses of organic fertilization, as well as *in vitro* under the influence of physical and chemical factors, in order to evaluate its effects over growth and content of total cardenolides. The method for quantifying total cardenolides by UV spectrophotometry was validated, with selection at 494 nm for not presenting significant absorption in reading solution without the addition of coloring reagent, remaining linear in the range from 0.025 to 0.125 mg/mL, $R^2=0.9994$. Inter-day (DPR = 3.26%) and intra-day (DPR = 3.58%) precision were considered exact from low to intermediate concentrations in the linear interval (98.4% and 98.9%), and robust for the reaction time of 25 min, with small variations in the length of the reading wave. The organic fertilization evaluated was chicken manure. The doses of this manure that better provided number and gain of foliar biomass were of 6 and 9 kg m⁻². The absence of fertilizer provided greater root biomass gains, higher R/PA relation and higher average contents of cardenolides. However, cardenolide productivity were superior with the dose of 6 kg m⁻². Concerning the chemical factors, different concentrations and combinations of cytokines BAP and TDZ (mg L⁻¹) were used, in a total of thirteen treatments. A higher number of sprouts occurred with the BAP + TDZ combinations of 0.5 + 0.5; 0.25 + 0.75; 1.0 + 0.5 mg L⁻¹. The average accumulation of dry biomass and productivity of total cardenolides was favored with the combination of 0.375 + 0.125 mg L⁻¹. The effect of physical factors, such as intensity, quality and light shock were also evaluated. Intensity and light shock with 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ produced greater the aerial part, root and total biomass, as well as higher content and productivity of total cardenolides. Blue LEDs favored both biomass production of the aerial part and productivity of total cardenolides. Therefore, the method was linear, precise, exact, robust, selective and reproducible, with ease of execution. The application of 6 kg m⁻² of chicken manure in *in vitro* cultivation; the combination of 0.375 + 0.125 mg L⁻¹ of BAP + TDZ supplemented to a MS culture medium; intensity and light shock with 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; and blue LED in *in vitro* cultivation provided good conditions for the cultivation of the species, with increments in the production of biomass and productivity of total cardenolides.

Keywords: UV spectrophotometry. Cytokines. LEDs. Digitalis compounds.

LISTA DE SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	Benzilaminopurina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
2Pi	2-isopenteniladenina
MS	Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)
SH	Meio de cultura de Schenk e Hildebrandt (1972)
TDZ	Tidiazuron
YMB	Meio de cultura Yeast Malt. Broth

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE		
1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Aspectos gerais da espécie.....	12
2.2	Atividades biológicas da espécie.....	14
2.3	Química dos heterosídeos digitálicos do gênero e da espécie.....	17
2.4	Micropropagação e o cultivo <i>in vitro</i> de <i>Digitalis</i> spp.....	21
2.5	Adubação orgânica.....	24
2.6	Validação de métodos analíticos.....	26
	REFERÊNCIAS	28
SEGUNDA PARTE-ARTIGOS		
ARTIGO 1 Validação analítica e quantificação de cardenolídeos totais de <i>Digitalis purpurea</i> subsp. <i>heywoodii</i> cultivadas em diferentes doses e tipo de adubação avícola.....		37
1	INTRODUÇÃO	38
2	MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1	Análises quantitativas de cardenolídeos: validação analítica do método	39
2.1.1	EQUIPAMENTO E REAGENTES.....	39
2.1.2	EXTRAÇÃO DE CARDENOLÍDEOS.....	39
2.1.3	REAÇÃO DE COLORAÇÃO E LEITURA DAS ABSORBÂNCIAS	40
2.1.4	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	40
2.2	Obtenção de mudas e instalação do experimento	42
2.3	Doseamento dos cardenolídeos totais	43
2.4	Análise estatística	44
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
ARTIGO 2 Regeneração de brotos, produção de biomassa e cardenolídeos em <i>Digitalis purpurea</i> subsp. <i>heywoodii</i> influenciados por reguladores de crescimento.....		62
1	INTRODUÇÃO	63
2	MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1	Estabelecimento dos explantes	65
2.2	Indução de brotos	65
2.3	Análise quantitativa de cardenolídeos	66
2.4	Análise estatística	67
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
ARTIGO 3 Diferentes condições de luz no crescimento e produção de cardenolídeos em <i>Digitalis purpurea</i> subs. <i>heywoodii</i> cultivadas <i>in vitro</i>		76
1	INTRODUÇÃO	77
2	MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1	Estabelecimento dos explantes	78
2.2	Crescimento <i>in vitro</i> e produção de cardenolídeos	78
2.3	Doseamento de cardenolídeos totais	81
2.4	Análise estatística	82

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS.....	94
	ANEXO A.....	98
	APÊNDICE A.....	105

1-INTRODUÇÃO GERAL

A demanda por plantas medicinais e aromáticas como matérias-primas para a produção de produtos farmacêuticos e agroalimentares, cosméticos naturais e perfumes tem crescido nos últimos anos. Entretanto, a taxa de crescimento vegetativo e o teor dos produtos naturais dos vegetais podem ser afetados, significativamente, pelas condições ambientais sob as quais as plantas são cultivadas. A disponibilidade de nutrientes e de luminosidade representa um fator chave na determinação da taxa biossintética e acúmulo de metabolitos secundários (ALVARENGA et al., 2015).

Sistemas de produção orgânica têm apresentado um crescimento exponencial em popularidade nos últimos anos. Contudo protocolos para sistemas orgânicos na produção agrícola de plantas medicinais são ainda carentes (SURRAGE et al., 2010). Na produção de plantas medicinais e aromáticas, estes têm se tornado quase obrigatórios, uma vez que atualmente a maioria das grandes empresas de produtos farmacêuticos à base de plantas, têm dado preferência a materiais vegetais que vêm de culturas biodinâmicas ou orgânicas certificadas (FERRAZ et al., 2014).

Neste mesmo contexto, como o cultivo em condições naturais afeta a produção de metabólicos secundários, devido sua dependência às condições edafoclimáticas, estratégias de produção baseadas em métodos de cultura de tecidos vegetais têm sido estudadas para melhorar a produção de derivados químicos específicos de grande interesse para a indústria farmacêutica (KREIS; HENSEL; STUHLEMMER, 1998; PEREZ-ALONSO et al., 2009; VERMA et al., 2011).

Entre as técnicas de cultura *in vitro*, a micropropagação é a mais largamente utilizada, já que fornece plantas geneticamente idênticas, em curto período de tempo, livre de infecções e variações sazonais e somaclonais (SHEKHAWAT; SHEKHAWAT, 2010; ZUZARTE et al., 2010). Além disso, por esse processo pode ocorrer direcionamento das vias biossintéticas, o que pode facilitar o aumento da taxa de metabolismo em comparação com plantas cultivadas *in vivo* (NAIK; MANOHAR; MURTHY, 2011; RAO; RAVISHANKAR, 2002). No entanto, para atender a estes objetivos diferentes estratégias, tais como a otimização do meio de cultura, a modificação genética, a seleção de plantas altamente produtoras, a fonte de explante, a presença ou ausência de fatores físicos, químicos ou biológicos necessitam de avaliações (RODRÍGUEZ-SAHAGÚN et al., 2012).

Espécies do gênero *Digitalis* são medicinalmente e economicamente importantes porque são a principal fonte de cardenólídeos, em especial, digitoxina e digoxina. Estas substâncias são empregadas no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ICC), pois aumentam a força das contrações sistólica e regulam o ritmo cardíaco (MÜLLER-URI; KREIS, 2010; SALES et al., 2002). Além dos efeitos cardiotônicos da digoxina e digitoxina, estudos têm apontado serem agentes eficazes em quimioterapia de câncer, especialmente da próstata e da mama (LÓPEZ-LÁZARO et al., 2003; NEWMAN; YANG; PAWLUS, 2008; YEH et al., 2001). Recentes estudos também têm sugerido atividade antiviral do glicoevatromosídeo contra cepas do herpes-vírus simples 1 e 2, substância pertencente também a classe dos cardenólídeos (BERTOL et al., 2011).

O cultivo em campo das espécies de *Digitalis* é a principal fonte para obtenção de cardenólídeos, mas várias limitações nesse método, como clima e solo, tem afetado a produção de material vegetal e metabólico secundário pelas espécies (ALONSO et al., 2009). Devido a importância medicinal, objetivou-se avaliar o efeito no crescimento vegetativo e na produção de cardenólídeos totais de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas em vasos com diferentes doses de adubação orgânica e de fatores físicos e químicos na sua propagação *in vitro*.

2-REFERENCIAL TEÓRICO

2.1-Aspectos gerais da espécie

Membros do gênero *Digitalis* são medicinalmente importantes porque são a principal fonte de glicosídeos cardíacos, fármacos que aumentam a força das contrações sistólica e regulam o ritmo cardíaco (MÜLLER-URI; KREIS, 2010). Este gênero pertencia à família Scrophulariaceae Juss., mas hoje é classificado como um gênero da família Plantaginaceae (SERRANO et al., 2014).

O nome *Digitalis* vem do latim que significa "dedo de uma luva", que se refere à forma das flores. As espécies são nativas da África do Norte, Europa e partes da Ásia com os principais centros de diversidade no Mediterrâneo Ocidental e Oriental. Todas as espécies de *Digitalis* são ervas bienais ou perenes, raramente pequenos arbustos com folhas simples, alternadas, que são muitas vezes dispostas em rosetas. A corola tubular cilíndrica ou tuboglobulosa é frequentemente contraída na base com limbo contendo dois lábios. O lábio superior é geralmente mais curto que o inferior. As flores são zigomorfas e dispostas em

racemos terminais. Suas brácteas variam em cor com a espécie, do roxo ao rosa, branco e amarelo (BRÄUCHLER; MEIMBERG; HEUBL, 2004; CLEMENTE et al., 2011).

O gênero *Digitalis*, vulgarmente conhecido como "dedaleira", possui cerca de 20 espécies, incluindo *D. ferruginea* L. subsp. *schischkinii*, *D. thapsi* L.; *D. trojana* Ivan, *D. lanata* Ehrh. e *D. purpurea* L., dentre outras. Apenas duas espécies, *D. lanata* e *D. purpurea*, são economicamente importantes por serem altamente exploradas para atender a crescente demanda de cardenólídeos da indústria farmacêutica (CLEMENTE et al., 2011).

Conforme citado por Serrano et al. (2014), *Digitalis purpurea* é representada por três subespécies: *Digitalis purpurea* L. subsp. *purpurea* var. *purpurea*, *Digitalis purpurea* L. subsp. *mariana* (Boiss.) Rivas Goday e *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* P. Silva & M. Silva, sendo esta última endêmica da região portuguesa de Reguengos de Monsaraz. Segundo Navarro et al. (2000) existem diferenças botânicas e fitoquímicas entre *D. purpurea* subsp. *heywoodii* e *D. purpurea*.

A espécie *Digitalis purpurea* L. apresenta folhas oval-oblonga ou lanceolada, séssil ou sustentada num pecíolo alado, se organizam alternadamente formando rosetas na parte basal. No segundo ano de vegetação surge um caule ereto que pode alcançar de 1,0-1,5 metros de altura; sua inflorescência, disposta em racimo, apresenta coloração púrpura claro, com cálice pentalobado e corola tubulosa; fruto ovóide capsular, bilocular, revestido de indumento de pêlos e glândulas pediceladas, e contém minúsculas sementes (MOCHIZUKI, 2014; PATIL; AHIRE; NIKAM, 2012; SILVA, 2012). A planta inteira é considerada tóxica, incluindo as raízes e sementes (PATIL et al., 2013).

A espécie apresenta grande variação no desenvolvimento da população. Suas sementes são consideradas ortodoxas e a germinação é restrita a solo sem vegetação, por isso frequentemente é encontrada em pastagens (HAY; PROBERT; COOMBER, 1997; SLETVOLD; RYDGREN, 2007).

Sua propagação é feita por sementes em sementeira, com plantação definitiva na primavera em terrenos não calcáreos, úmidos, fresco e sombrios (MOCHIZUKI, 2014; SILVA, 2012). A colheita deve ser feita em dias secos, durante à tarde, momento em que ocorre maior conteúdo de heterosídeos ativos; e, preferencialmente, no segundo ano de vegetação, período em que ocorre o florescimento da planta e quando as folhas acumulam maior teor de constituinte ativo. O processo de secagem deve ser rápido e utilizar estabilização a 80 °C para destruição da enzima digipurpuridase (MOCHIZUKI, 2014).

D. purpurea spp. *heywoodii* P. Silva & M. Silva (Figura 1) apresenta folhas basais oval-lanceoladas, densamente branco-lanosas, particularmente na parte inferior, com tricomas compridos glandulares e tricomas curtos glandulares. As brácteas são lanceoladas, ligeiramente mais longas ou mais curtas do que pedicelos. Pedicelos com indumento de tricomas não glandulares tão ou mais longos que o diâmetro do pedicelo e tricomas glandulares mais curtos que o diâmetro do pedicelo. Sépalas pubescentes-glandulares, corola 35-42 mm, com escassamente pubescente no terço distal ou somente na margem, branco, por vezes, com a margem rosa, com pontos roxos muito pequenos na parte inferior interna. Esta subespécie de *Digitalis* é endêmica de Portugal (Alto Alentejo) e Espanha (Badajoz, Cordoba, Jaén - Provincia Luso-Extremadurensis, Setor Mariânico-Monchiquense) (VALDÉS; TALAVERA; FERNANDÉZ-GALIANO, 1987).

Figura 1- Hábito de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii*. A- Planta florida. B- Plantas em estágio vegetativo cultivadas em vasos.



Fonte: A-<http://www.jelitto.com/Seed/Range+Of+Products/DIGITALIS+purpurea+ssp+heywoodii+Portion+s.html>. B- Do autor (2016).

2.2-Atividades biológicas da espécie

As espécies de *Digitalis lanata* e *Digitalis purpurea* são exploradas industrialmente para a produção de digoxina e digitoxina, cardenolídeos empregados clinicamente na insuficiência cardíaca congestiva (PÁDUA et al., 2012). O uso de extratos de *Digitalis* no tratamento de doenças cardíacas foi relatado pela primeira vez por William Withering em 1785 (WITHERING, 2014). Estima-se que cerca de 2,5 milhões de brasileiros, 5 milhões de americanos e 15 milhões em todo o mundo sofrem de insuficiência cardíaca (BRAGA; VIRIATO, 2010).

Adicionalmente aos usos clínicos convencionais dos cardenólídeos, recentes pesquisas têm apontando outras atividades biológicas importantes para os extratos de folhas de *Digitalis* spp. A maioria dos estudos relatou promissoras atividades biológicas desses extratos, tais como as atividades: antimicrobiana em *D. lamarckii* Ivan (BENLI et al., 2009); antioxidante em *D. lamarckii*, *D. trojana*, *D. davisiana* e *D. cariensis* (CINGOZ; VERMA; GUREL, 2014); antitumoral em *D. purpurea* (JIN et al., 2011; LÓPEZ-LÁZARO et al., 2003) e na maioria das espécies de *Digitalis* (KHAN et al., 2009; NEWMAN; YANG; PAWLUS, 2008). A monodigitoxigenina, glicoevatromonosídeo, predominante produzido em *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* foi relatado ser ativo contra cepas do vírus do herpes humano (BERTOL et al., 2011). Dentre estas atividades, a mais promissora aplicação dos compostos digitálicos tem sido no desenvolvimento de novas drogas contra diversos tipos de câncer.

Estes estudos iniciaram com Stenkvisst e colaboradores que observaram que mulheres sob terapia digitálica, após mastectomia apresentavam 9,6 vezes menos recorrência do àqueles que não fizeram uso dessa terapia (STENKVIST et al., 1982). Depois disso, numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* verificaram estes achados iniciais em diferentes tipos de câncer (KULIKOV et al., 2007; LÓPEZ-LÁZARO, 2007; MEKHAIL et al., 2006; MIJATOVIC et al., 2006, 2007; NEWMAN; YANG; PAWLUS, 2008; PLATZ et al., 2011; WINNICKA; BIELAWSKI; BIELAWSKA, 2006). Conforme Verma et al. (2016), as descobertas recentes sugerem que os derivados cardenolídicos, ativam fatores imunorreativos *digoxin-like* sendo responsáveis pela regulação da proliferação celular tumoral e normal humana.

Navarro et al. (2000) avaliaram o efeito cardiovascular de *D. purpurea* spp *heywoodii* utilizando o extrato metanólico da planta em animais através da administração via intragástrica, e observaram aumento na contração do átrio de coelhos; efeito diurético em ratos, com ligeiro aumento na excreção de sódio e atividade emética em pombos.

Estudo realizado por Oh et al. (2005) demonstrou o potencial terapêutico do purpureasídeo A, um glicosídeo feniletanóide, isolado de *D. purpurea*. Este cardenolídeo suprimiu a produção induzida de lipopolissacarídeo (LPS) de óxido nítrico (molécula considerada prejudicial no processo de inflamação) em macrófagos, por inibir a ativação de AP-1, um fator de transcrição que regula a formação de proteínas pró-inflamatórias em macrófagos ativos durante processos inflamatórios.

López-Lázaro et al. (2003) demonstraram a atividade citotóxica *in vitro* de *D. purpurea* L. subsp. *heywoodii*, em três linhagens de células cancerígenas humanas resistentes: TK-10 (adenocarcinoma renal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e UACC-62 (melanona

maligno). O extrato metanólico feito a partir de folhas da planta foi capaz de induzir a apoptose nessas linhagens celulares. Atividade biológica similar também foi demonstrada pelos compostos gitoxina e gitoxigenina.

Trenti et al. (2014) também testaram o efeito anticancerígeno do glicosídeo cardiotônico ouabaína, em duas linhagem de células humanas com câncer de pulmão: a A549 e H1975. Esses autores verificaram que a ouabaína modula quinases de sinalização múltiplas em células como JNK (c-Jun N-terminal Cinase) e AMPK (Proteína Cinase Ativada por Adenosina Monofosfato), levando à morte celular autofágica. A ativação do JNK pareceu ser essencial para a indução de autofagia pela ouabaína, já que a inibição de JNK é suficiente para prevenir a morte celular. Assim, considerando sua citotoxicidade em células cancerígenas, os glicosídeos cardíacos e seus derivados representam forma promissora de quimioterapia específica contra o câncer.

O efeito citotóxico foi demonstrado por Rocha et al. (2014), em células HeLa e RKOAS45-1, através da adição de um grupo estireno ao anel lactona da digoxina, para se obter 21-benzilideno digoxina (21-BD), esse sintético foi capaz de melhorar a Na, K-ATPase em células intactas, além de reduzir a viabilidade celular via apoptose para o câncer, e aumentar a impermeabilidade das junções de células epiteliais. A modificação química da digitoxina com o grupo estireno mostrou potencial de fornecer compostos com novas propriedades que poderiam resultar benefícios no tratamento do câncer e outras doenças nas quais ocorre a proliferação celular.

Outras atividades biológicas das espécies de *Digitalis* e de seus compostos cardenolídeos também foram demonstradas em diversos estudos. Os efeitos protetores de toxicidade hepática e antioxidante do acteosídeo, um glicosídeo feniletanóide, foram observados por Lee et al. (2004), em fígados de camundongos, administrado por via intraperitoneal com soro fisiológico. O tratamento com acteosídeo protegeu uma possível hepatotoxicidade induzida pela administração de tetracloreto de carbono, impedindo o aumento da atividade enzimática de alanina e aspartato aminotransferase, a formação de malondialdeído hepática e o teor de glutathiona reduzida, e a eliminação de radicais superóxidos.

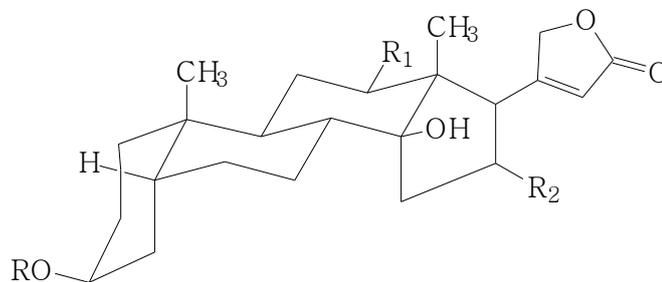
Portanto, derivados cardenolídeos presentes em plantas de *Digitalis* spp são responsáveis por diversas atividades biológicas, demonstrando o grande potencial medicinal desse gênero.

2.3- Química dos heterosídeos digitálicos do gênero e da espécie

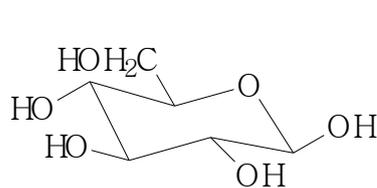
Os heterosídeos digitálicos compreendem uma grande família de compostos de origem natural, com uma considerável diversidade estrutural (DEWICK, 2009; RAHIMTOLA; TAK, 1996). O primeiro constituinte, responsável pela atividade biológica da planta, a ser isolado foi a digitalina, em 1867, por Nativelle. No ano de 1922 já haviam sido descobertos os compostos digitoxina, digitonina, digitalinum verum e a gitoxina. Mas foi com Stoll, em 1927, que foram isolados os heterosídeos puros, sendo este um marco histórico dos trabalhos com *D. purpurea*. Posteriormente, conseguiu-se o mesmo com outras espécies de *Digitalis* (SILVA, 2012).

Os heterosídeos digitálicos são caracterizados por um núcleo esteroidal com seus anéis posicionados em *cis-trans-cis*, possuindo um grupo 14 β -hidroxila e a substituição do C-17 β por um anel lactônico pentagonal α,β insaturado. Na posição 3 β está ligada uma cadeia lateral de açúcar com até cinco unidades de carboidrato, contendo glicose e vários açúcares raros de 6-desoxi, 2,6-didesoxi e 6-desoxi-3-metoxi, tais como D-fucose, D-digitoxose ou D-digitalose. De acordo com sua genina eles são divididos em 6 séries, nomeadas de A a F, conforme a Figura 2 (KREIS; HENSEL; STUHLEMMER, 1998). As agliconas esteroidais ou geninas são de dois tipos: cardenolídeos (esqueleto carbônico contendo 23 átomos de carbono) ou bufadienolídeo (esqueleto carbônico contendo 24 átomos de carbono). O anel lactônico de 5 membros é o que caracteriza a genina dos cardenolídeos, sendo seu homólogo caracterizado pela presença de um anel lactônico duplamente insaturado de 6 membros na mesma posição do anel esteroidal (DEWICK, 2009). Devido a estrutura química complexa sua síntese química em escala industrial é inviável. Dessa forma, eles são obtidos de folhas de espécies de *Digitalis*, cuja concentração varia de 0,5% a 1,5% (LUCKNER; WICHTL, 2000).

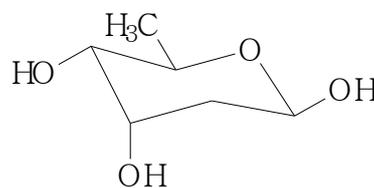
Figura 2- Estruturas químicas das seis diferentes séries e dos diferentes açúcares comuns dos heterosídeos digitálicos.



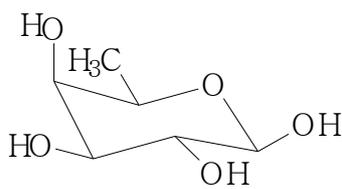
Genina digitálica	R ₁	R ₂	Série
Digitogenina	H	H	A
Gitoxigenina	H	OH	B
Digoxigenina	OH	H	C
Diginatigenina	OH	OH	D
Gitaloxigenina	H	OCHO	E
Oleandrigenina	H	OCOCH ₃	F



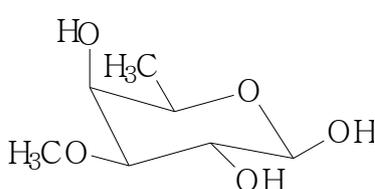
β -D-glicose



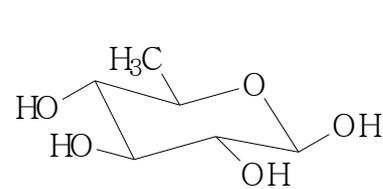
β -D-digitoxose



β -D-fucose



β -D-digitalose



β -D-quinovose

Fonte: Kreis, Hensel e Stuhlemmer (1998).

A espécie *Digitalis lanata* apresenta cerca de 0,9-1,5% de cardenólídeo total em seu peso seco, sendo os principais constituintes o lanatosídeo C, lanatosídeo A, glicolanadoxina, digitalinum verum, glicogitorosídeo, glicoverodoxina e glicoevatromonosídeo (CLEMENTE et al., 2011). Análise por CLAE-UV em extratos de *Digitalis lanata* micropropagadas

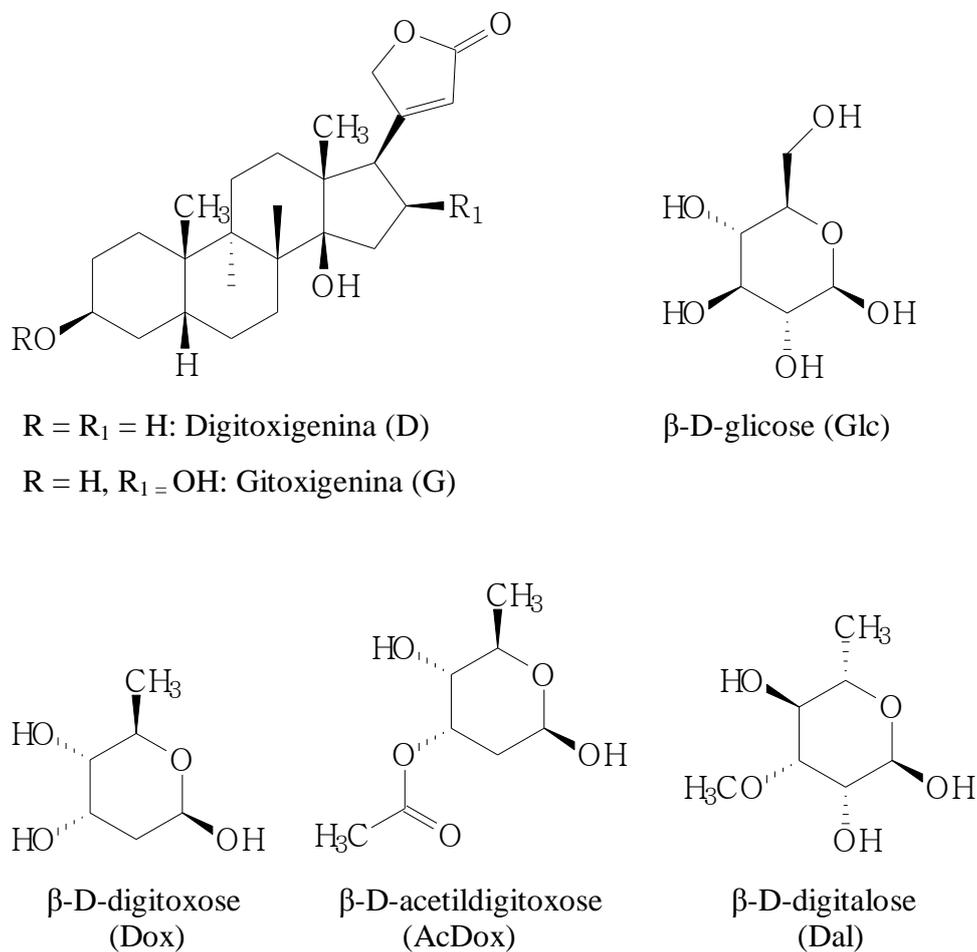
detectaram a presença de digoxigenina, deacetillanatosídeo C, lanatosídeo C, digoxina (série C), digitoxigenina, desacetil-lanatosídeo A e digitoxina (série A) (VELA et al., 1991).

Estudo recente com propagação *in vitro* de brotos e regeneração de plântulas via calos demonstrou a presença de purpureaglicosídeo A, glicoevatromonosídeo, lanatosídeo A, digitoxina, evatromonosídeo, α -acetildigitoxina em *D. mariana* subsp. *heywoodii* (KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015).

Em *D. purpurea* podem ser encontrados cerca de 30 tipos de cardenólídeos diferentes, e o teor total depende da idade da planta. Em folhas secas com 1 ano de idade em estágio vegetativo pode-se acumular aproximadamente de 0,4-1% de cardenólídeos totais; enquanto que no estágio de florescimento o acúmulo gira em torno de 0,3-0,8% de cardenólídeos totais na matéria seca das folhas. Os principais cardenólídeos encontrados na espécie são purpureaglicosídeo A, glicogitaloxina e purpureaglicosídeo B. Podendo-se encontrar também, mas em pequenas quantidades, outros compostos digitálicos, como o digitalinum verum, glicoverodoxina, digitoxina, gitaloxina, gitoxina, glicoevatromonosídeo, glicolanadoxina, glicogitorósido, estropsídeo, verodoxina e glicogitaloxigenina bis-digitoxosídeo, além de antranóides, saponinas, digitanol e outros compostos secundários (CLEMENTE et al., 2011). Oh et al. (2005) isolaram, a partir das folhas de *D. purpurea*, quatro glicosídeos feniletanóides diferentes: purpureasídeo A, desramnosil acteosídeo, calceolariosídeo B e plantainosídeo D. Jin et al. (2011), também isolaram e elucidaram a estrutura química de dois novos glicosídeos fenilatanóides na espécie, purpureasídeo D e purpureasídeo E.

A presença de glicosídeos cardiotônicos em folhas *D. purpurea* subsp. *heywoodii* foi descrito em 1963, com o isolamento de oito compostos: lanatosídeo A, lanatosídeo B, purpureaglicosídeo A, purpureaglicosídeo B, glicoevatromonosídeo, glicolanatosídeo, digitalium verum e estrospeídeo (DANIEL, 2006; NAVARRO et al., 2000). A estrutura química dos cardenólídeos digitálicos isolados de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* estão representadas na Figura 3.

Figura 3- Estruturas químicas de cardenólídeos isolados de *D. purpurea* subsp. *heywoodii*.



Cardenólídeo	Estrutura molecular
Lanatosídeo A	D-(Dox-Dox-AcDox-Glc)
Lanatosídeo B	G-(Dox-Dox-AcDox-Glc)
Purpureaglicosídeo A	D-(Dox-Dox-Dox-Glc)
Purpureaglicosídeo B	G-(Dox-Dox-Dox-Glc)
Glicoevatromonosídeo	D-(Dox-Glc)
Digitalium verum	G-(Dal-Glc)
Estrospeídeo	G-(Dal)

Fonte: Daniel (2006), Kreis, Haug e Yücesan (2015) e Navarro et al. (2000).

2.5- Micropropagação e o cultivo *in vitro* de *Digitalis* spp

O cultivo em campo de *Digitalis* apresenta várias limitações, como a coleta indiscriminada das espécies que constitui uma séria ameaça à existência das populações selvagens, especialmente quando as plantas são colhidas bem antes da maturação das sementes. Além disso, a propagação natural através de sementes apresenta taxas de germinação muito baixas, e não permite uma produção eficiente de número de plantas (VERMA et al., 2016).

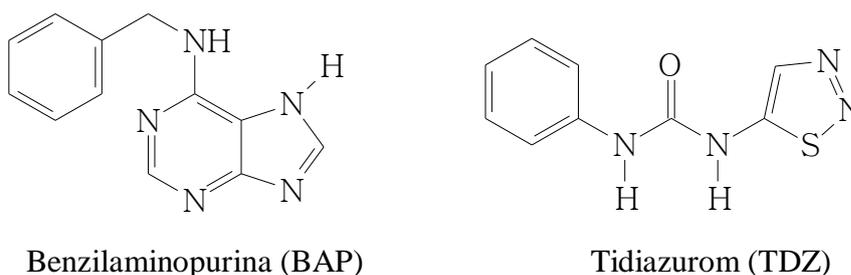
A micropropagação é um processo biotecnológico altamente viável que proporciona plantas geneticamente idênticas e rápida propagação, além de permitir o controle do crescimento vegetativo e desenvolvimento, bem como a biossíntese de metabólitos secundários *in vitro* (CORDUK; AKI, 2010; GHANEM et al., 2010; PATIL et al., 2013; SALES et al., 2002). No entanto, para atender a estes objetivos é necessário avaliar diferentes parâmetros que controlam a morfogênese e o metabolismo *in vitro*, tais como a otimização do meio de cultura, reguladores de crescimento, regimes de luz, temperatura, dentre outros (RODRÍGUEZ-SAHAGÚN et al., 2012). O estabelecimento de um protocolo de cultura de tecidos é uma etapa decisiva para as espécies de *Digitalis*, principalmente para as bienais, uma vez que, no cultivo a longo prazo, essas plantas em campo aberto não conseguiram germinar no final do segundo período de vegetação (VERMA et al., 2014). Mas, vários protocolos envolvendo o gênero *Digitalis* tem sido desenvolvidos (VERMA et al., 2012).

Os reguladores de crescimento influenciam sobremaneira o crescimento e desenvolvimento *in vitro*. O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984), além da influência endógena.

As citocininas são reguladores de crescimento que pertencem ao grupo de substâncias que promovem a divisão celular, e sua origem está relacionada com a adenina. Quimicamente são compostas por um anel adenílico prenilado. Na cultura de tecidos elas são usadas para promover a indução de brotos adventícios a partir de calos ou gemas axilares ou apicais (CID, 2010). No entanto, o tipo e a concentração das citocininas utilizadas no meio de cultura são essenciais para um bom resultado no cultivo *in vitro* (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010). O BAP, cuja cadeia lateral isoprenoide foi substituída por um anel benzênico, é a citocinina mais utilizada na micropropagação. O TDZ é uma feniltiadiazoluréia que também

pode agir como citocinina, e vem tornando-se eficaz na multiplicação de diversas espécies (CID, 2010; FLORES et al., 2009; SILVA et al., 2008). Segundo Fatima et al. (2009), o BAP é a citocinina que tem mostrado melhores resultados em *Digitalis*. A Figura 3 apresenta as estruturas químicas das citocininas BAP e TDZ.

Figura 4- Estrutura química das citocininas BAP e TDZ.



Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p6186?lang=pt®ion=BR>.

Diversos trabalhos estudaram a composição e a concentração de reguladores de crescimento, presentes no meio de cultura, e seus efeitos na diferenciação e morfogênese dos explante de *Digitalis*, bem como o teor de cardenólídeos sintetizados por eles. Cacho et al. (1991) investigaram os efeitos das auxinas: 2,4-D, ANA e AIA, isoladamente e em combinação com cinetina ou BAP em potencial regenerativo de folha, de raiz e de hipocótilo de explantes *D. thapsi*. Os resultados indicaram que a aplicação de 2,4-D, ANA ou BAP aumentou a formação de calos; no entanto, combinações de ANA com cinetina ou BAP foram mais eficazes para a organogênese em explantes oriundos de hipocótilo. Onisei, Amariei e Toth (1992) propagaram brotações de *D. lanata* e *D. purpurea* em meio MS suplementado com diferentes reguladores de crescimento. A resposta destas duas espécies em termos de organogênese foi similar, mas a capacidade de regeneração de *D. purpurea* foi ligeiramente mais rápida do que *D. lanata*. A taxa de sobrevivência em *D. lanata* foi de apenas 65-70% após aclimação, em comparação com 95-98% para *D. purpurea*. Bosila et al. (2003) investigaram a influência de diferentes explantes (brotações terminais, folha, hipocótilo e raiz) de *D. lanata* em meio MS contendo 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Os autores observaram alta indução e produção de cardenólídeo em calos derivados de explantes foliares. Fátima et al. (2009) relataram o efeito de reguladores de crescimento na indução de calos, o

crescimento de calos e regeneração de rebentos de *D. lanata*. O resultado indicou que houve indução de calo, nos tratamentos contendo 6,0 mg L⁻¹ de ANA e 3,0 mg L⁻¹ de BAP, mas a combinação de citocininas (BAP e cinetina) a 0,5 a 3,0 mg L⁻¹ com ANA aumentou o crescimento dos calos. Por outro lado, a regeneração de brotos foi melhor no meio MS contendo 6,0 mg L⁻¹ de BAP. Gurel et al. (2011) demonstraram a regeneração *in vitro* de *D. davisiana* e a produção de glicosídeo cardiotônico. Seis tipos diferentes de meios de cultura foram avaliados. O meio LS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de TDZ e 0,25 mg L⁻¹ AIA foi o mais eficiente para a produção de brotações, especialmente quando explantes de hipocótilos ou foram utilizados.

A luz é outro fator chave que altera o desenvolvimento das plantas, devido seu impacto sobre a morfogênese. Diferentes regimes de luz causam mudanças fisiológicas e morfológicas nas plantas, e seu potencial vai depender de sua adaptação a essas condições (RESENDE et al., 2011). Entre as várias condições de cultura, o regime de luz, incluindo a intensidade e os espectros de luz têm sido apontados por ser um dos fatores que influenciam o acúmulo de metabolitos secundários. Em ambientes controlados é possível alterar a qualidade (comprimentos de onda distintos), a intensidade (densidade de fluxo de fótons) e o regime de luz (fotoperíodo) (SÁEZ et al., 2013).

Diodos emissores de luz (LEDs) estão sendo amplamente utilizados em culturas de tecidos e células vegetais em substituição as lâmpadas fluorescentes comuns, pois esta é composta por vários comprimentos de ondas desnecessários para a promoção de crescimento de determinadas espécies, enquanto que as LEDs apresentam um único comprimento de onda (LEE et al., 2007, 2014; LIN et al., 2013).

Estudos são necessários para se conhecer o sistema de luz adequado para se aplicar à finalidade desejada, como inibição da parte aérea e crescimento das raízes, formação e crescimento de plântulas, produção de metabólitos secundários, dentre outros fatores (KIM et al., 2004; LIAN; MURTHY; PAEK, 2002). A importância da fonte de luz em culturas *in vitro* tem sido avaliada em diferentes espécies de plantas (ADIL; ABBASI; KHAN, 2015; AHMAD et al., 2014; ALI; ABBASI, 2014; ALVARENGA et al., 2015; ANASORI; ASGHARI, 2009; CHRISTOPHE; MOULIA; VARLET-GRANCHER, 2006; HAHN; KOZAI; PAEK, 2000; LEICHT; SILANDER, 2006; SHIN et al., 2008; TARIQ; ALI; ABBASI, 2014; WANG et al., 2001).

Estudos tem relatado uma correlação positiva entre luz, teor de clorofila e produção de cardenolídeos em *Digitalis purpurea* e *Digitalis lanata* (EISENBEIß; KREIS; REINHARD,

1999; HAGIMORI; MATSUMOTO; OBI, 1982; OHLSSON; BJORK; GATENBECK, 1983; REINHARDT; BOY; KAISER, 1975). No entanto, não há estudos na literatura com regimes luminosos para o cultivo *in vitro* de *D. purpurea* L. subsp. *heywoodii*.

2.6- Adubação orgânica

A disponibilidade de nutrientes representa um fator chave na determinação da taxa biossintética e acúmulo de metabolitos secundários (ALVARENGA et al., 2015). Sabe-se que macro e microelementos desempenham papéis essenciais no crescimento e desenvolvimento das plantas e estão envolvidos em numerosos processos fisiológicos, incluindo a respiração, fotossíntese e a formação da parede celular. Estes nutrientes fornecem os cofatores requeridos por numerosas enzimas do metabolismo primário e secundário e, a disponibilidade limitada ou ausência de um elemento, podem induzir a alterações na biossíntese e/ou capacidade catabólica do metabolismo vegetal (FIGUEIREDO et al., 2008). Os efeitos da fertilização orgânica e/ou química em plantas medicinais têm sido demonstrados para diversas espécies de plantas (ALVARENGA et al., 2015; BUCHWALD et al., 2015; CHAGAS et al., 2011; CORREA et al., 2010; COSTA et al., 2013; DAHMARDEH, 2012; FERRAZ et al., 2014; IBRAHIM et al., 2013; KOZERA; MAJCHERCZAK, 2011; PANDEY; PATEL; PATRA, 2015; TAIE; SALAMA; RADWAN, 2010).

Sistemas de produção orgânica têm apresentado um crescimento exponencial em popularidade nos últimos anos. Contudo protocolos para sistemas orgânicos na produção agrícola de plantas medicinais são ainda escassos (SURREAGE et al., 2010). Na produção de plantas medicinais e aromáticas, estes tem se tornado quase obrigatórios, uma vez que atualmente a maioria das grandes empresas produtoras de produtos farmacêuticos à base de plantas, têm dado preferência a materiais vegetais que vêm de culturas biodinâmicas ou orgânicas certificadas (FERRAZ et al., 2014).

A matéria orgânica do solo é oriunda de resíduos de plantas e de animais em fases de decomposição. Ela atua como reserva de nitrogênio e outros elementos considerados essenciais para as plantas. Os resíduos orgânicos contém quantidades variáveis de elementos minerais, que tornam-se disponíveis às plantas à medida que se decompõem (LOPES, 1998). No entanto, esses nutrientes são liberados à planta de forma gradual, o que torna uma vantagem, pois se forem imediatamente disponibilizados, como ocorre com os fertilizantes químicos, podem ocorrer perdas por volatilização, fixação ou lixiviação (MAIA et al., 2008).

Dentre as vantagens da fertilização orgânica citam-se a manutenção da umidade, da fertilidade e da estrutura física do solo, o favorecimento do controle microbiológico e a dinâmica de nutrientes, o que afeta favoravelmente nos rendimentos da produção vegetal (CHAGAS et al., 2011).

Dentre os resíduos orgânicos utilizados, a conversão de cama de frango/resíduos de esterco de aves em fontes de nutrientes orgânicos para o cultivo de plantas oferece uma opção comercialmente viável para melhorar o rendimento da cultura e gerir a eliminação segura de resíduos perigosos (PANDEY; PATEL; PATRA, 2015).

A produção de glicosídeos cardiotônicos por *Digitalis* tem várias limitações pela agricultura tradicional, sendo enormemente influenciada pelas condições de solo (ALONSO et al., 2009). Desse modo, a adubação orgânica pode ser uma alternativa ao cultivo convencional, pois além de melhorar a estrutura biológica, física e química do solo, ainda fornece uma nutrição adequada (COSTA et al., 2013). Pode também exercer função de corretivo do solo, combinando-se com alguns elementos em excesso, para neutralizar ou reduzir seus efeitos tóxicos nas plantas (ROSAL; PINTO; BRANT, 2009).

No que tange a estudos de fertilização com espécies de *Digitalis*, apenas um estudo foi encontrado na literatura. Kozera e Majcherczak (2011) avaliaram os teores e as razões molares de macronutrientes em folhas de *Digitalis lanata* Ehrh. cultivadas sob diferentes doses de fertilização mineral. No geral, a utilização de diferentes proporções de NPK induziu um aumento significativo no conteúdo de nitrogênio, fósforo e potássio totais, mas reduziu a concentração de sódio nas folhas da dedaleira quando comparadas ao controle. Após as fertilizações, as razões K:Ca e K:Na nas folhas foram significativamente aumentadas e a relação Ca:P foi diminuída. Valores altamente significativos foram observados para a relação K:(Mg+Ca) nas folhas após aplicação de 80 kg N + 34,96 kg P + 99,6 kg K (214,6 kg NPK, dose intermediária) e 120 kg N + 52,44 kg P + 149,4 kg K (321,8 kg NPK, maior dose). A relação Ca:Mg foi claramente diminuída em comparação ao controle após o uso da menor dose avaliada (40 kg N + 17,48 kg P + 49,8 kg K = 107,3 kg NPK). No entanto, os autores não avaliaram a influência dessas adubações nos parâmetros de crescimento e nos teores de cardenólídeos. Devido a importância de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* como fonte de cardenólídeos e, principalmente de gluevatromonosídeo, a influência de tipos e doses de adubação orgânica no crescimento vegetativo e produção de cardenólídeos deve ser avaliada.

2.6-Validação de métodos analíticos

Para aplicar um método analítico a um produto diferente, devem ser considerados estudos de validação apropriados com a matriz do novo produto. Validação de um método analítico é o processo de demonstrar que um procedimento analítico é adequado para o seu fim. Esse entendimento é obtido a partir de estudos cientificamente baseados em métodos de desenvolvimento e otimização (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2014).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente, algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através da ICH (“International Conference on Harmonization”), na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos (RIBANI et al., 2004). A norma Q2(R1), “Validation of analytical procedures: text and methodology” da ICH recomendada utilizar para o processo de validação os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH, 1996). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta a validação de métodos analíticos através da RE nº 899, que recomenda os mesmos parâmetros, cujas análises são requeridas pelas autoridades de saúde brasileiras para o registro de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2003, 2014).

A especificidade/seletividade corresponde à capacidade de detecção de substâncias; a linearidade é utilizada para verificar se o método está gerando resultados lineares, que devem ser proporcionais à concentração do analito; a exatidão verifica o quanto o valor real do analito na amostra está em concordância com o valor estimado pelo processo analítico; a precisão vai avaliar quão próxima estão as várias medidas efetuadas na mesma amostra; o limite de detecção refere-se a menor concentração do analito que pode ser detectada; o limite de quantificação é a menor concentração do analito quantificada na amostra; e a robustez é a capacidade do método em não sofrer alterações mesmo em pequenas variações nos parâmetros analíticos (BRITO et al., 2003).

As técnicas mais utilizadas nas análises qualitativas e quantitativas de amostras vegetais são cromatografia em fase gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE) e eletroforese capilar (EC) (NAVES et al., 2014). No entanto, o método de determinação quantitativa por espectrofotometria no UV-Vis ainda se destaca entre estas, por ser uma técnica de baixo custo, de fácil manuseio, rápida e muito adequada às rotinas laboratoriais (ALVES et al., 2015; NAVES et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ADIL, M.; ABBASI, B. H.; KHAN, T. Interactive effects of melatonin and light on growth parameters and biochemical markers in adventitious roots of *Withania somnifera* L. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 123, p. 405-412, 2015.
- AHMAD, N. et al. Effect of reverse photoperiod on in vitro regeneration and piperine production in *Piper nigrum* L. **C R Biologies**, v. 337, p. 19-28, 2014.
- ALI, M.; ABBASI, B. H. Light-induced fluctuations in biomass accumulation, secondary metabolites production and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **J Photochem Photobiol B: Biology**, v. 140, p. 223-227, 2014.
- ALONSO, N. P. et al. Cardiotoxic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v. 99, p. 151-156, 2009.
- ALVARENGA, I. C. A. et al. Effects on growth, essential oil content and composition of the volatile fraction of *Achillea millefolium* L. cultivated in hydroponic systems deficient in macro- and microelements. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 329-338, 2015.
- ALVES, I. A. B. dos S. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de *Simarouba amara* Aubl. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 37-47, 2015.
- ANASORI, P.; ASGHARI, G. Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. **Res Pharm Sci**, v. 3, p. 59-63, 2009.
- BENLI, M. et al. Antimicrobial activity of endemic *Digitalis lamarekii* Ivan from Turkey. **Indian J of Exp Biol**, v. 47, p. 218-221, 2009.
- BERTOL, J. W. et al. Anti-herpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Res**, v. 92, p. 73-80, 2011.
- BOSILA, H. A. et al. Factors affecting callus production and glycosidal content of leaf tissue culture of *Digitalis lanata* Ehrh. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS, 2., 2003. **Proceedings...** 2003. p. 289-301.
- BRAGA, G. A.; VIRIATO, M. D. **O uso do carvedilol na insuficiência cardíaca: um estudo de revisão**. 2010. 40 p. Monografia - Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 26**, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília,

DF, 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132>. Acesso em: 7 fev. 2017.

BRÄUCHLER, C.; MEIMBERG, H.; HEUBL, G. Molecular phylogeny of the genera *Digitalis* L. and *Isoplexis* (Lindley) Loudon (Veronicaceae) based on ITS and trnL-F sequences. **Pl Syst Evol**, v. 248, p. 111-128, 2004.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos : estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUCHWALD, W. et al. Effect of fertilization on roseroot (*Rhodiola rosea* L.) yield and content of active compounds. **Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus**, v. 14, n. 2, p. 109-121, 2015.

CACHO, M. et al. Morphogenesis in leaf, hypocotyl and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, p. 117-123, 1991.

CHAGAS, J. H. et al. Produção da hortelã-japonesa em função da adubação orgânica no plantio e em cobertura. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 412-417, 2011.

CHRISTOPHE, A.; MOULIA, B.; VARLET-GRANCHER, C. Quantitative contributions of blue light and PAR to the photocontrol of plant morphogenesis in *Trifolium repens* (L.). **J Exp Bot**, v. 57, p. 2379-2390, 2006.

CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2010. 303 p.

CINGOZ, G. S.; VERMA, S. K.; GUREL, E. Hydrogen peroxide-induced antioxidant activities and cardiogenic glycoside accumulation in callus cultures of endemic *Digitalis* species. **Plant Physiol Biochem**, v. 82, p. 89-94, 2014.

CLEMENTE, E. S. et al. *Digitalis*. In: KOLE, C. (Ed.). **Wild crop relatives: genomic and breeding resources, plantation and ornamental crops**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. chap. 5, p. 73-112.

CORDUK, N.; AKI, C. Direct shoot organogenesis of *Digitalis trojana* Ivan., an endemic medicinal herb of Turkey. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 1587-1591, Aug. 2010.

CORRÊA, R. M. et al. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.

COSTA, A. G. et al. Produção de biomassa, rendimento e composição química do óleo essencial de hortelã-pimenta usando diferentes fontes de adubação org. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 3, p. 202-210, maio/jun. 2013.

DAHMARDEH, M. Effect of mineral and organic fertilizers on the growth and calyx yield of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 48, p. 10899-10902, 2012.

- DANIEL, M. **Medicinal plants: chemistry and properties.** Science, 2006. 128 p.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** 3rd ed. Chichester: J. Wiley, 2009. 550 p.
- EISENBEIß, M.; KREIS, W.; REINHARD, E. Cardenolide biosynthesis in light- and dark-grown *Digitalis lanata* shoot cultures. **Plant Physiol. Biochem**, v. 37, n. 1, p. 13-23, 1999.
- FATIMA, Z. et al. Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates. **Turk J Bo**, v. 33, p. 393-405, 2009.
- FERRAZ, E. O. et al. Organic systems in the growth and essential-oil production of the yarrow. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 1, p. 111-119, 2014.
- FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour Frag. J**, v. 23, p. 213-226, 2008.
- FLORES, R. et al. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 11, n. 3, p. 292-299, 2009.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: analytical procedures and methods validation for drugs and biologics.** 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2017.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture.** Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.
- GHANEM, S. A. et al. *In vitro* propagation and cardiac glycosides content of *Digitalis lanata*. **International Journal of Academic Research**, v. 2, n. 6, p. 348-356, 2010.
- GUREL, E. et al. Regeneration and cardiotoxic glycoside production in *Digitalis davisiana* Heywood (Alanya Foxglove). **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 104, p. 217-225, 2011.
- HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T.; OBI, Y. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture II: effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by Undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. **Plant Physiology**, v. 69, p. 653-656, 1982.
- HAHN, E. J.; KOZAI, T.; PAEK, K. Y. Blue and red light-emitting diodes with or without sucrose and ventilation affect *in vitro* growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets. **J Plant Biol**, v. 43, p. 247-250, 2000.
- HAY, F.; PROBERT, R.; COOMBER, S. Development of desiccation tolerance and longevity in seeds from detached capsules of foxglove (*Digitalis purpurea* L.). **Annals of Botany**, v. 79, p. 419-427, 1997.

IBRAHIM, M. H. et al. Impact of organic and inorganic fertilizers application on the phytochemical and antioxidant activity of kacip fatimah (*Labisia pumila* Benth). **Molecules**, v. 18, p. 10973-10988, 2013.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures: methodology, Q2B** (CPMP/ICH/281/96). London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

JIN, Q. et al. Phenylethanoid Glycosides from *Digitalis purpurea* L. **Bull. Korean Chem. Soc**, v. 32, n. 5, p. 1721-1724, 2011.

KHAN, M. I. et al. *Digitalis*, a targeted therapy for cancer? **Am J Med Sci**, v. 337, p. 355-359, 2009.

KIM, S. J. et al. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 101, p. 143-151, 2004.

KOZERA, W.; MAJCHERCZAK, E. Content of macronutrients and values of mole ratios in leaves of the woolly foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh.) cultivated under differentiated mineral fertilization. **Journal of Elementology**, v. 16, n. 4, p. 555-565, 2011.

KREIS, W.; HAUG, B.; YÜCESAN, B. Somaclonal variation of cardenolide content in Heywood's foxglove, a source for the antiviral cardenolide glucoevatromonoside, regenerated from permanent shoot culture and callus. **In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant**, v. 51, p. 35-41, 2015.

KREIS, W.; HENSEL, A.; STUHLEMMER, U. Cardenolide biosynthesis in Floxglove. **Planta Med**, v. 64, p. 491-499, 1998.

KULIKOV, A. et al. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembr**, v. 1768, p. 1691-1702, 2007.

LEE, K. J. et al. Protective effect of acteoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. **Life Sciences**, v. 74, n. 8, p. 1051-1064, 2004.

LEE, S. H. et al. Photon flux and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal, plantlets. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 90, p. 141-151, 2007.

LEE, S. W. et al. Influence of different LED lamps on the production of phenolic compounds in common and Tartary buckwheat sprouts. **Ind Crops Prod**, v. 54, p. 320-326, 2014.

LEICHT, S. A.; SILANDER, J. A. Differential responses of invasive *Celastrus orbiculatus* (Celastraceae) and native *C. scandens* to changes in light quality. **Am J Bot**, v. 93, p. 972-977, 2006.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação in vitro de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, mar./abr. 2010.

LIAN, M. L.; MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the in vitro induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid "Pesaro". **Scientia Horticulturae**, v. 94, p. 365-370, 2002.

LIN, K. H. et al. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). **Sci Hortic**, v. 150, p. 86-91, 2013.

LOPES, A. S. **Manual internacional de fertilidade do solo**. 2. ed. Piracicaba: Instituto da Potassa e Fosfato, 1998.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 11, p. 1043-1053, 2007.

LÓPEZ-LÁZARO, M. et al. Anti-tumour activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. *heywoodii*. **Planta Medica**, v. 69, n. 8, p. 701-704, Aug. 2003.

LUCKNER, M.; WICHTL, M. Digitalis. In: LUCKNER, M.; WICHTL, M. (Ed.). **Digitalis: geschichte, biologie, biochemie, chemie, physiologie**. 2000.

MAIA, S. S. S. et al. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo do bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Ciência Agrárias**, v. 3, n. 4, p. 327-331, 2008.

MEKHAIL, T. et al. Phase 1 trial of Anvirzel™ in patients with refractory solid tumors. **Invest. New Drugs**, v. 24, p. 423-427, 2006.

MIJATOVIC, T. et al. Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. **Neoplasia**, v. 8, p. 402-412, 2006.

MIJATOVIC, T. et al. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Rev. Cancer**, v. 1776, p. 32-57, 2007.

MOCHIZUKI, R. Y. **Dedaleira**. Disponível em:
<<http://www.uepg.br/fitofar/dados/dedaleira.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2014.

MÜLLER-URI, F.; KREIS, W. Recent advances in cardenolide research. **Buletinul Academiei de Stiinte a Moldovei**, v. 311, p. 45-52, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAIK, P. M.; MANOHAR, S. H.; MURTHY, H. N. Effects of macro elements and nitrogen source on biomass accumulation and bacoside A production from adventitious shoots cultures of *Bacopa monnieri* (L.). **Acta Physiol Plant**, v. 33, p. 1553-1557, 2011.

NAVARRO, E. et al. Cardiovascular activity of a methanolic extract of *Digitalis purpurea* spp. *heywoodii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 437-42, 2000.

NAVES, L. N. et al. Desenvolvimento de método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de lupeol em nanocápsulas poliméricas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 35, n. 3, p. 473-478, 2014.

NEWMAN, R.; YANG, P.; PAWLUS, A. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. **Mol Interv**, v. 8, p. 36-49, 2008.

OH, J. W. et al. Effects of phenylethanoid glycosides from *Digitalis purpurea* L. on the expression of inducible nitric oxide synthase. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 903-910, July 2005.

OHLSSON, A. B.; BJORK, L.; GATENBECK, S. Effect of light on cardenolide production by *Digitalis lanata* tissue cultures. **Phytochemistry**, v. 22, n. 11, p. 2447-2450, 1983.

ONISEI, T.; AMARIEI, D.; TOTH, E. A comparative study of plant regeneration efficiency of two *Digitalis* species. **Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, v. 57, p. 45-49, 1992.

PADUA, R. M. et al. Biotransformation of 21-O-acetyl-deoxycorticosterone by cell suspension cultures of *Digitalis lanata* (strain W.1.4). **Steroids**, v. 77, p. 1373-1380, 2012.

PANDEY, V.; PATEL, A.; PATRA, D. D. Amelioration of mineral nutrition, productivity, antioxidant activity and aroma profile in marigold (*Tagetes minuta* L.) with organic and chemical fertilization. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 378-385, 2015.

PATIL, J. G.; AHIRE, M. L.; NIKAM, T. D. Influence of plant growth regulators on *in vitro* seed germination and seedling development of *Digitalis purpurea* L. **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2012.

PATIL, J. G. et al. *In vitro* propagation and production of cardiotoxic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 2379-2393, 2013.

PEREZ-ALONSO, N. et al. Cardiotoxic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 99, p. 151-156, 2009.

PLATZ, E. A. et al. Re: a novel two-stage, transdisciplinary study identifies digoxin as a possible drug for prostate cancer treatment. **Cancer Discov**, v. 1, p. 68-77, 2011.

RAHIMTOLA, S. H.; TAK, K. The use of *Digitalis* in heart failure. **Curr. Probl. Cardiol**, v. 21, p. 781-853, 1996.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotech Adv**, v. 20, p. 150-153, 2002.

REINHARDT, E.; BOY, M.; KAISER, F. Umwandlung von *Digitalis*-Glykosiden durch Zellsuspensionskulturen. **Planta Med Sup**, v. 27, p. 163-168, 1975.

RESENDE, S. V. et al. Influência da luz e substrato na germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de *Calliandra benth.* (Mimosoideae - Leguminosae) endêmicas da chapada diamantina, Bahia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 107-117, 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, S. C. et al. 21-Benzylidene Digoxin: a proapoptotic cardenolide of cancer cells that Up-Regulates Na, K-ATPase and epithelial tight junctions. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 1-14, 2014.

RODRÍGUEZ-SAHAGÚN, A. et al. Plant cell and tissue culture as a source of secondary metabolites. In: ORHA, I. E. (Ed.). **Biotechnological production of plant secondary metabolites**. Turkey: Benthan Books, 2012. p. 3-20.

ROSAL, L. F.; PINTO, J. E. B. P.; BRANT, R. da S. Produção de biomassa e óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schlechter. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, v. 2, n. 2, p. 39-44, 2009.

SÁEZ, P. L. et al. Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant Science**, v. 201, p. 12-24, 2003.

SALES, E. et al. Plant hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82 . 139 induce efficient plant regeneration in the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. **Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 9-16, 2002.

SCHENK, R.; HILDEBRANDT, A. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Journal of Botany**, v. 50, p. 199-204, 1972.

SERRANO, R. et al. Application of microscopy to *Digitalis thapsixDigitalis purpurea* natural hybrid identification. In: MÉNDEZ-VILA, A. (Ed.). **Microscopy: advances in scientific research and education**. Formatex Research Center, 2014. v. 1, p. 377-384. (FORMATEX Microscopy Series, 6).

SHEKHAWAT, M. S.; SHEKHAWAT, N. S. Micropropagation of *Arnebia hispidissima* (Lehm). DC. and production of alkannin from callus and cell suspension culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1445-1450, Dec. 2010.

SHIN, K. S. et al. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. **Acta Physiol Plant**, v. 30, p. 339-343, 2008.

- SILVA, J. V. S. da. **Contribuição para o estudo molecular e morfológico de espécies do género *Digitalis* L.** 2012. 68 f. Tese (Doutorado)-Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.
- SILVA, T. dos S. et al. Multiplicação in vitro de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 13, n. 1957, p. 1-6, 2008.
- SLETVOLD, N.; RYDGREN, K. Population dynamics in *Digitalis purpurea*: the interaction of disturbance and seed bank dynamics. **Journal of Ecology**, v. 95, n. 6, p. 1346-1359, Nov. 2007.
- STENKVIST, B. et al. Cardiac glycosides and breast cancer revisited. **N. Engl. J. Med**, v. 306, p. 484, 1982.
- SURRAGE, V. A. et al. Benefits of vermicompost as a constituent of growing substrates used in the production of organic greenhouse tomatoes. **HortScience**, v. 45, n. 10, p. 1510-1515, 2010.
- TAIE, H. A. A.; SALAMA, Z. A. R.; RADWAN, S. Potential activity of basil plants as a source of antioxidants and anticancer agents as affected by organic and bio-organic fertilization. **Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj**, v. 38, n. 1, p. 119-127, 2010.
- TARIQ, U.; ALI, M.; ABBASI, B. H. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. **J Photochem Photobiol B: Biology**, v. 130, p. 264-271, 2014.
- TRENTI, A. et al. Cardiac glycoside ouabain induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via a JNK-dependent decrease of Bcl-2. **Biochemical Pharmacology**, v. 89, p. 197-209, 2014.
- VALDÉS, B.; TALAVERA, S.; FERNANDÉZ-GALIANO, E. **Flora vascular de Andalucía Occidental 2**. 2. ed. Barcelona: Ketres, 1987.
- VELA, S. et al. Micropropagation of juvenile and adult *Digitalis obscura* and cardenolide content of clonally propagated plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 27, p. 143-146, July 1991.
- VERMA, S. K. et al. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Digitalis lamarckii* Ivan., an endemic medicinal species. **Turk J Bot**, v. 35, p. 1-7, 2011.
- VERMA, S. K. et al. Direct somatic embryogenesis from hypocotyl segments of *Digitalis trojana* Ivan and subsequent plant regeneration. **Industrial Crops & Products**, v. 40, p. 76-80, 2012.
- VERMA, S. K. et al. Embryogenesis, plant regeneration and cardiac glycoside determination in *Digitalis ferruginea* subsp. *ferruginea* L. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 119, p. 625-634, 2014.
- VERMA, S. K. et al. *In vitro* culture of *Digitalis* L. (Foxglove) and the production of cardenolides: an up-to-date review. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 20-51, 2016.

WANG, Y. C. et al. Improved growth of *Artemisia annua* L. hairy roots and artemisinin production under red light conditions. **Biotechnol Lett**, v. 23, p. 1971-1973, 2001.

WINNICKA, K.; BIELAWSKI, K.; BIELAWSKA, A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. **Acta Pol. Pharm**, v. 63, p. 109-115, 2006.

WITHERING, W. **An account of the foxglove and some of its medical uses**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. 236 p.

YEH, J. et al. Inhibitory effects of *Digitalis* on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. **Journal Urology**, v. 166, p. 1937-1942, 2001.

ZUZARTE, M. R. et al. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 580-587, Nov. 2010.

ARTIGO 1

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA E QUANTIFICAÇÃO DE CARDENOLÍDEOS
TOTAIS DE *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* CULTIVADA EM DIFERENTES
DOSES DE ADUBAÇÃO AVÍCOLA**

RESUMO: *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* (Plantaginaceae), é uma planta medicinal produtora do cardenolídeo glicoevatromonosídeo, com grande potencial contra o vírus do herpes humano. Condições nutricionais de solo influenciam grandemente a produção de princípios ativos em plantas medicinais. Objetivou-se validar o método analítico para a quantificação de cardenolídeos totais de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* sob diferentes doses de esterco avícola, além de avaliar os efeitos dessa adubação na produção de biomassa pela espécie. O experimento foi composto da mistura de solo + areia 2:1, acrescidos das doses de 0,0 (controle); 1,5; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 kg m⁻² de adubo. Após 120 dias avaliaram-se o número de folhas, biomassa seca de folhas, raízes e total, relação raiz/parte aérea, teor e produtividade de cardenolídeos totais. Um método analítico por espectrofotometria no UV/Vis foi validado para o doseamento de cardenolídeos totais, expressos em equivalentes em β-metilgioxina (%). O método se mostrou seletivo a 494 nm, por não ter apresentado absorção significativa em solução de leitura sem adição do reagente de coloração, sendo linear na faixa de 0,025 a 0,125 mg/mL, R²=0,9994. Apresentou precisão inter-dia (DPR = 3,26%) e intra-dia (DPR = 3,58%), sendo considerado exato com recuperação média de 98,05% e robusto para o tempo de reação de 25 min e frente a pequenas variações no comprimento de onda de leitura. As doses que melhor proporcionaram número e ganho de biomassa foliar foram as de 6 kg m⁻² e 9 kg m⁻². A ausência de adubo m proporcionou melhor ganho de biomassa pela raiz e uma maior relação R/PA. Plantas não adubadas apresentaram maiores teores médios de cardenolídeos, com 0,924% ± 0,001, seguida da dose de 6 kg m⁻², com 0,843% ± 0,006, com uma diferença de apenas 0,081% na produção. Portanto, o método de quantificação de cardenolídeo por espectrofotometria a 494 nm, mostrou-se linear, preciso, exato, robusto, seletivo e reproduzível, e com facilidade de execução. O uso de 6 kg m⁻² de esterco de galinha proporciona maior ganho de biomassa foliar e produtividade de cardenolídeos totais em *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii*.

Palavras-chave: Plantaginacea. Planta medicinal. Princípio ativo. Espectrofotometria no UV.

1- INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Digitalis*, conhecidas popularmente como dedaleira, são plantas medicinais da família Plantaginaceae, comumente utilizadas no tratamento de insuficiência cardíaca e arritmias, devido à presença dos cardenólídeos digitoxina e digoxina (KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015). Estudos com plantas desse gênero, incluindo *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* têm sugerido outros usos medicinais, em especial na oncologia e na virologia (BERTOL et al., 2011; LOPEZ-LAZARO, 2003; NAVARRO et al., 2000).

Os glicosídeos cardiotônicos são compostos esteroidais complexos, e sua síntese química é considerada economicamente inviável, assim sua obtenção ainda depende do cultivo em campo das espécies de *Digitalis* (GHANEM et al., 2010; PATIL et al., 2013). No entanto, as produções de biomassa vegetal e glicosídeos cardiotônico por *Digitalis* têm várias limitações através da agricultura tradicional, sendo grandemente influenciada pelas condições de solo (ALONSO et al., 2009).

A adubação orgânica é preferencialmente recomendada para o cultivo de plantas medicinais. Este sistema de produção tem se tornado quase obrigatório para estas espécies, uma vez que atualmente a maioria das grandes empresas produtoras de produtos farmacêuticos à base de plantas, têm dado preferência a materiais vegetais que vêm de culturas biodinâmicas ou orgânicas certificadas (FERRAZ et al., 2014). Porém, a dosagem utilizada é essencial para um bom desenvolvimento da planta, pois deficiência ou excesso podem influenciar na produção de biomassa e quantidade de princípios ativos (MAIA et al., 2008; SODRÉ et al., 2012).

As respostas das plantas medicinais aos efeitos da adubação orgânica na produção de biomassa vegetal e princípios ativos são variáveis para cada espécie (BRANT et al., 2010; BRITO et al., 2015). Apenas um estudo de fertilização com *Digitalis* foi encontrado na literatura. O estudo desenvolvido por Kozera e Majcherczak, (2011) avaliaram os teores e as razões molares de macronutrientes em folhas de *Digitalis lanata* Ehrh. cultivadas sob diferentes doses de fertilização mineral. No entanto, os autores não avaliaram a influência dessas adubações nos parâmetros de crescimento e nos teores de cardenólídeos.

No que tange as técnicas modernas de análises de produtos naturais, o método de determinação quantitativa por espectrofotometria no UV-Vis ainda se destaca entre outras, por ser uma técnica de baixo custo, de fácil manuseio, rápida e muito adequada às rotinas laboratoriais (ALVES et al., 2015; NAVES et al., 2014). No entanto, para garantir que um método analítico gere informações confiáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação, a fim de garantir que medições em análises de rotina sejam o mais

próxima possível de um valor verdadeiro desconhecido, com o teor do analito na amostra (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA estabelece rigorosos parâmetros a serem seguidos para a validação de métodos analíticos, descritos na Resolução nº 899/2003 (BRASIL, 2003).

Digitalis purpurea subsp. *heywoodii* é uma espécie pouco estudada (NAVARRO et al., 2000), não havendo relatos do uso de adubação orgânica para seu cultivo. Dessa forma objetivou-se validar o método analítico para a quantificação de cardenolídeos totais de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* sob diferentes doses de esterco avícola, além de avaliar os efeitos dessa adubação na produção de biomassa pela espécie.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análises quantitativas de cardenolídeos: validação analítica do método

2.1.1 EQUIPAMENTO E REAGENTES

As leituras de absorção molecular no ultravioleta foram mensuradas em espectrofotômetro TECAN Infinity® M200 PRO operado pelo *software* I-control® versão 3.37. A substância de referência utilizada nos ensaios foi a β -metildigitoxina, com grau de pureza de 97% (CLAE).

2.1.2 EXTRAÇÃO DE CARDENOLÍDEOS

A extração de cardenolídeos seguiu o protocolo proposto por Kreis, Haug e Yücesan (2015), com modificações. Folhas secas em estufa ventilada a 70°C foram pulverizadas em micromoinho de facas. Uma massa de cerca de 100 mg de folhas pulverizadas foram extraídas com 1 mL de etanol a 70% (v/v) a 70 °C por sonicação, empregado-se 1 ciclo ininterrupto de 30 min. Após esse período, o extrato ficou por 5 min em gelo, e então microcentrifugado a 13000 g por 10 min e, ao sobrenadante foram adicionados 300 μ l de acetato de chumbo a 15% (p/v). Após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram novamente microcentrifugadas. Uma vez removido o precipitado, 200 μ L de solução aquosa de fosfato monossódico (Na_2HPO_2) a 10% (p/v) foram adicionados ao sobrenadante, e, em seguida, microcentrifugado. O sobrenadante foi transferido em partes iguais para dois microtubos e a eles adicionado 1 mL de clorofórmio:isopropanol (3:2 v/v) e centrifugado a 13000 g durante 5 min. A fase inferior foi transferida para um balão e, então rotaevaporada até *secura*.

2.1.3 REAÇÃO DE COLORAÇÃO E LEITURA DAS ABSORBÂNCIAS

Para a determinação quantitativa dos cardenolídeos foi adicionado ao resíduo da extração (item 2.1.2) um volume de 2 mL de metanol, seguido de sonicação até dissolução completa (1-2 min). A solução metanólica foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e em seguida, adicionou-se 5 mL de reagente de Baljet (95 mL de ácido pícrico a 1% + 5 mL de solução aquosa de NaOH a 10%), dado que os glicosídeos digitálicos desenvolvem uma coloração laranja avermelhada com esse reagente, devido a presença de um anel γ -lactônico insaturado em sua estrutura (BELL; KRANTZ, 1950), completando-se o volume com metanol. Após 20 minutos de reação, as leituras a 494 nm foram determinadas, frente ao branco. O branco foi obtido transferindo-se 5 mL de reagente de Baljet para um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com metanol.

Para cada solução elaborou-se uma solução de compensação misturando-se 2 mL de solução metanólica da amostra obtida conforme descrito anteriormente, e diluindo para 10 mL com metanol. As leituras das absorções a 494 nm das soluções de compensação foram mensuradas frente ao metanol. O valor de absorbância obtido para a solução de compensação foi então subtraído da leitura obtida para a amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.1.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação do método para a determinação do teor de cardenolídeos totais, expresso em β -metildigitoxina, foi realizada de acordo com os parâmetros e especificações da *International Conference on Harmonization* (ICH, 1996) e da RE n° 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003). Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

Seletividade: A seletividade do método foi avaliada a partir dos espectros de absorção molecular no ultravioleta a 494 nm das soluções de leitura com e sem a adição do reagente Baljet. Para atestar a seletividade do método a solução de leitura sem Baljet não deve apresentar absorção significativa no comprimento de onda da leitura.

Linearidade: Foram construídas duas curvas de calibração, empregando-se duas soluções metanólicas estoques (0,50 mg/mL) de β -metildigitoxina preparadas em dias consecutivos. As concentrações finais de β -metildigitoxina nas soluções de leitura foram 0,025 mg/mL; 0,05

mg/mL; 0,075 mg/mL; 0,1 mg/mL e 0,125 mg/mL. A solução de leitura foi composta de β -metildigitoxina nas concentrações finais já indicadas + 5 mL do reagente Baljet + MeOH para completar o volume de um balão volumétrico de 10 mL. Após 20 min de reação foram lidas a 494 nm frente ao branco (reagente de Baljet + MeOH). Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes determinados. Para a determinação quantitativa dos cardenólídeos empregou-se a média das curvas de calibração, após comparação estatística entre elas.

Precisão: A precisão intradia foi avaliada pela análise de seis amostras a 100% da concentração de β -metildigitoxina na curva analítica ($n=6$). Da mesma forma, a precisão interdia foi determinada em dois dias consecutivos e por analistas diferentes ($n=12$). Os desvios padrão relativos (DPR) foram calculados para os teores encontrados nas determinações ($n=6$ e $n=12$, respectivamente).

Exatidão: A exatidão foi avaliada pela adição de quantidades conhecidas de β -metildigitoxina às amostras a serem extraídas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* (item 2.2.2), a fim de determinar a porcentagem de recuperação. Foram adicionadas três concentrações de β -metildigitoxina, em triplicata para cada nível. Também foram preparadas, em triplicatas, amostras sem adição do padrão. A recuperação foi determinada empregando-se a equação: % de recuperação = (concentração experimental/concentração teórica) \times 100.

Robustez: A robustez foi avaliada por variações deliberadas dos seguintes parâmetros analíticos: volume do reagente Baljet (4,75; 5,0 e 5,25 mL), tempo de reação para a leitura (15, 20 e 25 minutos) e o comprimento de onda de leitura (492, 494 e 496 nm). Para cada parâmetro foram preparadas três amostras conforme itens 2.2.2 e 2.2.3. Os dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$).

Limite de quantificação: O limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir dos parâmetros da curva analítica, segundo a equação: $LQ = (s/S) \times 10$, em que s é o desvio padrão do intercepto da curva de regressão e S é a inclinação da curva.

Limite de detecção: O limite de detecção foi estimado pela equação: $LD = (s/S) \times 3,3$, em que s é o desvio padrão do intercepto da curva de regressão e S é a inclinação da curva analítica.

2.2 Obtenção de mudas e instalação do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, situada nas coordenadas geográficas 21° 14'S 00 W, a 918m de altitude.

Para a produção de mudas foram utilizadas sementes de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* adquiridas comercialmente (Jelitto Seeds[®], Alemanha), e germinadas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e aclimatizadas em casa de vegetação por 20 dias.

Em seguida as mudas foram transplantadas para vasos de plástico com capacidade de 8 litros contendo a mistura de solo + areia (2:1) e composto orgânico. Os tratamentos consistiram da aplicação de diferentes doses de esterco curtido de galinha, sendo: 1) solo + areia na proporção 2:1 (controle); 2) solo + areia na proporção 2:1 + 1,5 Kg m⁻² de esterco; 3) solo + areia na proporção 2:1 + 3,0 Kg m⁻² de esterco; 4) solo + areia na proporção 2:1 + 6,0 Kg m⁻² de esterco; 5) solo + areia na proporção 2:1 + 9,0 Kg m⁻² de esterco e 6) solo + areia na proporção 2:1 + 12,0 Kg m⁻² de esterco.

O solo empregado no experimento foi classificado como sendo do horizonte B do latossolo vermelho distroférico (textura argilosa) com as seguintes características químicas: pH em água= 6,0; P e K (mg dm⁻³) = 1,13 e 26,0 ; Ca, Mg, Al e H+ Al (cmol dm⁻³) = 1,20; 0,20; 0,00 e 1,86; saturação de bases V (%) = 44,04; matéria orgânica (dag Kg⁻¹) = 1,41; teor de argila (dag Kg⁻¹) = 64.

A análise química do esterco avícola resultou os seguintes valores: pH CaCl₂ 0,01M = 8,0 (1:2,5); Nitrogênio Total = 21,0 g Kg⁻¹; Fósforo (P₂O₅ Total) = 20,0 g Kg⁻¹; Potássio (K₂O Total) = 7,3 g Kg⁻¹; Cálcio (Ca Total) = 4,6 g Kg⁻¹; Magnésio (Mg Total) = 2,6 g Kg⁻¹; Enxofre (S Total) = 3,1 g Kg⁻¹; Boro (B Total) = 17,0 mg Kg⁻¹; Cobre (Cu Total) = 74,0 mg Kg⁻¹; Ferro (Fe Total) = 760,0 mg Kg⁻¹; Manganês (Mn Total) = 315,0 mg Kg⁻¹; Zinco (Zn Total) = 314,0 mg Kg⁻¹; Sódio (Na Total) = 2,2 g Kg⁻¹. O controle de plantas invasoras foi realizado manualmente e com turno de rega em dias alternados. Não houve infecção com patógenos e ataques de pragas.

O delineamento foi o inteiramente casualizado com cinco repetições e três vasos por repetição. Aos 120 dias foram avaliados: número de folhas por planta; biomassas secas de folhas, de raízes e total, e relação raiz/parte aérea; teor porcentual e produtividade de cardenólídeos totais (CT).

As determinações das biomassa secas nos experimentos foram realizadas com amostras desidratadas em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C, até peso constante, as quais foram expressas g planta⁻¹.

2.3 Doseamento dos cardenolídeos totais

O preparo das amostras e as leituras das absorvâncias para a determinação dos teores de cardenolídeos totais nas amostras de folhas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii*, cultivadas sob adubações orgânicas avícolas, foram obtidos conforme descrito nos itens 2.2.2 e 2.2.3. Com base nos parâmetros da curva analítica (item 2.2.4 – *Linearidade*), chegou-se a equação utilizada para o cálculo dos teores percentuais de cardenolídeos totais (CT), expressos em β-metildigitoxina:

$$\% \text{ CT} = 0,133 (A_{\text{corrigida}} - 0,0619) / m \text{ (g)}$$

Onde: $A_{\text{corrigida}}$ = absorvância corrigida a 494 nm

m = massa do material vegetal em grama.

Para maiores detalhes sobre esse cálculo vide Apêndice A.

Com base nos valores obtidos para a biomassa seca de folhas (g) e a concentração de cardenolídeos totais mensuradas a partir de 100 mg de folhas secas, calcularam-se a produtividade de cardenolídeos totais, em gramas por planta (g CT planta⁻¹) de cada tratamento. Para isso, empregou-se a fórmula: Produtividade de CT = BSF (g) × Concentração de CT (0,1g de folha seca).

2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas ao teste de Skott-Knott, ambas a 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011) foi utilizado para o processamento dos dados.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação analítica

Seletividade

O ensaio de seletividade foi conduzido com as soluções de leitura de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* com e sem o reagente de Baljet para verificação de possíveis interferentes nas amostras. Os espectros no ultravioleta registrados para as duas soluções de leitura na faixa de 230 a 800 nm estão representados nas Figuras 1 e 2.

No espectro da solução de leitura sem adição do reagente de Baljet constatou-se pequena absorção no comprimento de onda de leitura (494 nm). Essa pequena absorção não afeta a seletividade do método, pois a mesma é neutralizada pela solução de compensação, cuja absorbância é descontada da absorbância obtida das soluções de leitura com o reagente cromogênico.

No espectro de varredura obtido para as soluções de leitura com o reagente de Baljet nota-se uma banda intensa e com máximo de absorção a 494 nm, evidenciando que mesmo na presença de interferentes contidos nos extratos é possível quantificar o complexo formado entre o reagente de cor e o anel γ -lactônico insaturado das estruturas químicas dos cardenolídeos, desde que seja utilizada a solução de compensação para subtrair a coloração dos extratos.

Figura 1- Espectro de varredura no UV do extrato de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* sem adição do reagente Baljet, frente ao metanol.

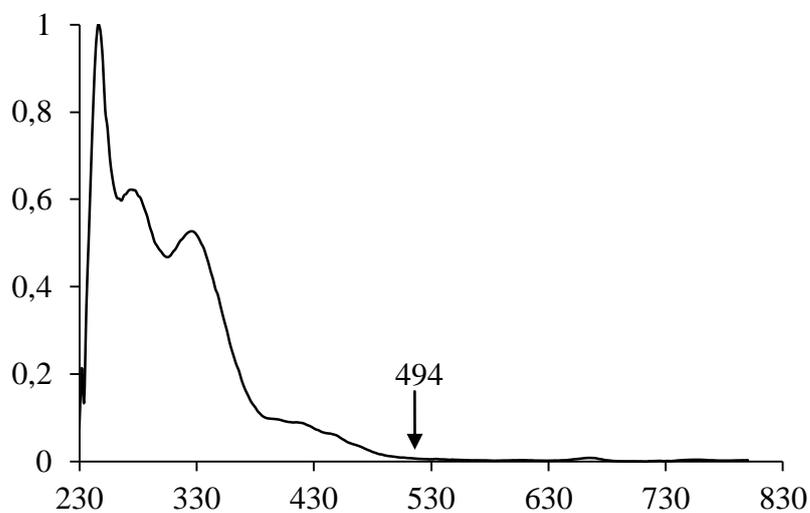
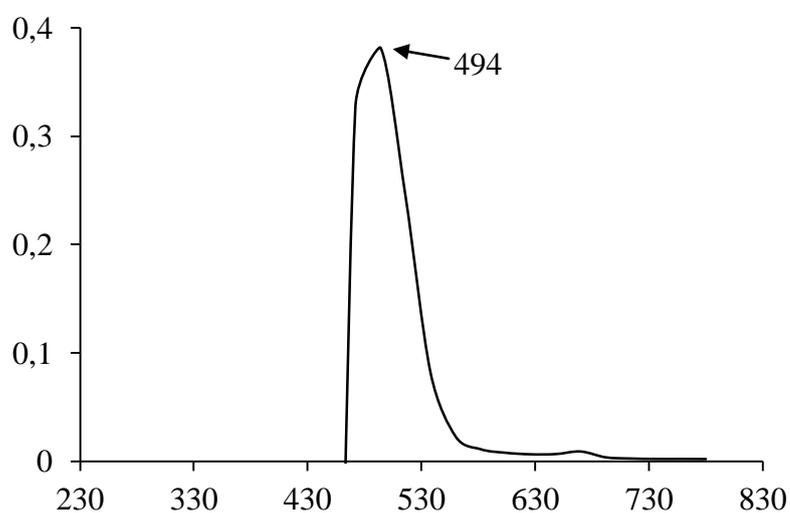


Figura 2- Espectro de varredura no UV do extrato de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* com adição do reagente Baljet, frente ao reagente de Baljet.



Linearidade

A linearidade foi avaliada através da relação linear entre absorvância e concentração de cardenólídeos totais. Para a construção da curva analítica durante o estudo de linearidade, empregaram-se soluções com concentrações conhecidas de β -metildigitoxina variando entre

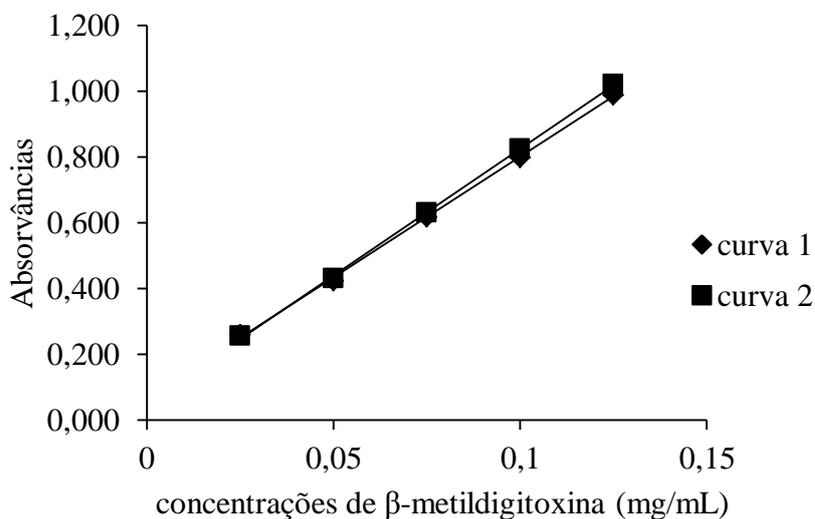
0,025 a 0,125 mg/mL. As soluções foram preparadas e analisadas em dois dias diferentes. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 1.

O método espectrofotométrico apresentou linearidade a 494 nm para a faixa de concentração estudada (0,025 mg/mL a 0,125 mg/mL). A equação de regressão linear média obtida a partir de duas curvas de calibração, foi $y = 0,1926x + 0,0552$, em que y é a absorbância (nm) e x a concentração (mg/mL) em equivalente de β -metildigitoxina. O coeficiente de determinação obtido foi $R^2 = 0,9994$, indicando relação linear entre a faixa de concentração da substância de referência *versus* as absorbâncias a 494 nm (Figura 3). O coeficiente de determinação obtido supera o mínimo estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2003) que considera o valor mínimo aceitável de $R^2 = 0,99$.

Tabela 1- Dados empregados na construção da curva analítica do β -metildigitoxina para o doseamento espectrofotométrico de cardenolídeos.

Concentração de β -metildigitoxina (mg/mL)	Absorvância a 494 nm das repetições	
0,025	0,261	0,256
0,050	0,424	0,431
0,075	0,617	0,630
0,100	0,798	0,825
0,125	0,989	1,022

Figura 3- Média das curvas analíticas de β -metildigitoxina obtidas por espectrofotometria (494 nm) para a quantificação de cardenólídeos. A equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2) se referem à média das duas curvas.



Precisão

Os resultados dos ensaios de repetibilidade (precisão intra-leituras, $n = 6$) e precisão intermediária (inter-leituras, $n = 12$) encontram-se na Tabela 3. Os valores de desvio padrão relativo abaixo de 5% indicaram que o método analítico apresenta precisão intra-dia e inter-dias, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 2- Teores de cardenólídeos totais em folhas de *D.purpurea* subsp. *heywoodii*, expressos em β -metildigitoxina, obtidos na determinação da precisão intra-corridas e inter-corridas.

Amostra	Cardenólídeos totais (%)	
	intra-dia	inter-dia
1	0,388	0,388
2	0,367	0,367
3	0,405	0,405
4	0,393	0,393
5	0,399	0,399
6	0,379	0,379
7	-	0,376
8	-	0,381
9	-	0,390
10	-	0,378
11	-	0,370
12	-	0,367
Teor médio (%)	0,389	0,383
DPR (%)	3,575	3,258

- não determinado, DPR: Desvio padrão relativo.

Exatidão

Os resultados de exatidão obtidos estão resumidos na Tabela 4. Os testes de recuperação foram realizados em três níveis de concentração diferentes: alta, média e baixa, a partir da fortificação do extrato de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* com uma solução de concentração conhecida de β -metildigitoxina.

O teor médio de cardenólídeos totais doseado nas amostras foi de 0,38%. As médias do ensaio de recuperação para os níveis baixo e médio de fortificação foram 98,4% e 98,9%, respectivamente. Estes valores estão próximos ao valor desejável de 95% a 105%, para analitos com concentrações entre 0,1% a 1% (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 2002; GONZALEZ; HERRADOR, 2007). Porém, no nível alto de fortificação verificou-se recuperação média de 86,64%, o que não atende os valores limítrofes desejáveis para exatidão de um método analítico. Tendo em vista essa baixa recuperação, o ciclo de extração foi dobrado.

Duas hipóteses foram levantadas para a ocorrência desse fenômeno. A primeira estaria associada a ineficiência do processo de extração que empregou 1 ciclo ininterrupto de 30 min

de extração a 70°C. Por outro lado, a segunda poderia ser devido a saturação do reduzido volume de solvente empregado no processo de microextração. Assim, a fim de melhorar a recuperação, mais 1 ciclo ininterrupto de 30 min de extração foi acrescido no método de microextração. Com isso, o método extrativo passou a empregar a sonicação a 70°C com 2 ciclos ininterruptos de 30 min. Com esta alteração, a recuperação média do nível alto de fortificação foi de 96,84%, valor ajustado ao desejável para ensaios de recuperação.

Tabela 3. Valores de recuperação de cardenolídeos totais no extrato etanólico de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* (média, $n = 3$).

Nível de fortificação	Quantidade de cardenolídeos totais (mg)			Recuperação ^d (%)	DPR (%)
	Extrato não fortificado ^a	Quantidade adicionada	Quantidade teórica ^b		
1 ciclo					
1a	0,52	0,02	0,54	0,53	97,80
1b	0,49	0,02	0,51	0,50	97,50
1c	0,50	0,02	0,52	0,52	99,92
2a	0,52	0,08	0,60	0,58	96,63
2b	0,49	0,08	0,57	0,58	100,75
2c	0,50	0,08	0,58	0,58	99,32
3a	0,52	0,16	0,68	0,59	83,77
3b	0,49	0,16	0,65	0,57	88,85
3c	0,50	0,16	0,66	0,58	87,32
2 ciclos					
3a	0,52	0,16	0,68	0,66	97,65
3b	0,49	0,16	0,65	0,62	95,76
3c	0,50	0,16	0,66	0,64	97,12

^a Quantidade (mg) de cardenolídeo total presente na solução de leitura proveniente do extrato não fortificado.

^b Quantidade (mg) de cardenolídeo total na solução de leitura + Quantidade (mg) de cardenolídeo fortificada = Quantidade teórica (μg)

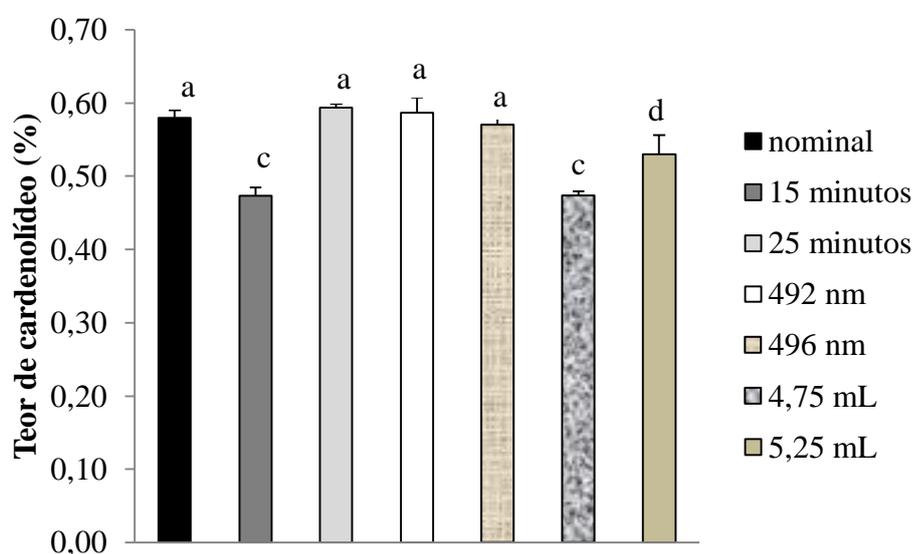
^c Quantidade (mg) de cardenolídeo total determinada experimentalmente presente na solução de leitura do extrato fortificado.

^d % recuperação = (concentração experimental ÷ concentração teórica) x 100.

Robustez

Os resultados encontrados no teste de robustez estão apresentados na Figura 4. Verificou-se que pequenas alterações nos comprimentos de onda de leitura e a ultrapassagem de 5 minutos no tempo de reação das amostras não diferiram estatisticamente em relação à condição nominal. Entretanto, para as variações do volume do reagente de Baljet empregados no método e o tempo de 15 minutos de reação das amostras, ocorreram diferenças estatísticas quando comparadas à condição nominal. Dessa forma, o método é considerado robusto frente a pequenas mudanças na leitura do comprimento de onda e no avanço de tempo de reação do método de até 5 minutos. No entanto, o emprego de tempo de reação menor que o estabelecido para o método, bem como alterações no volume do reagente de Baljet indicaram comprometerem a quantificação de cardenolídeos totais nas amostras de *D. purpurea* subsp. *heywoodii*.

Figura 4- Influência do tempo de reação, comprimento de onda e volume de reagente de Baljet na quantificação de cardenolídeo, expresso em β -metildigitoxina, em 100 mg de folhas de *D.purpurea* subsp. *heywoodii*.



As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Desvio padrão e médias ($n = 3$).

Limite de quantificação

A determinação dos limites de quantificação foi realizada a partir da equação que emprega os parâmetros da curva analítica média. O limite de quantificação foi de 0,0112 mg/mL, caracterizando a alta sensibilidade de quantificação do método.

Limite de detecção

Os limites de detecção foram estimados a partir dos parâmetros obtidos da curva analítica média, conforme descrito no item 2.2.4. O limite de detecção foi de 0,0039 mg/mL, caracterizando a alta sensibilidade de detecção do método.

3.1 Produção de biomassa e cardenólídeos totais

Houve efeito significativo da adubação orgânica no crescimento de *D.purpurea* subsp. *heywoodii*. A adição do esterco de galinha apresentou resposta positiva para número de folhas, biomassa seca de folhas, biomassa seca total e produtividade de cardenólídeos totais, quando comparados ao tratamento controle (Tabela 4, Figura 5). Os melhores resultados para as duas primeiras variáveis mencionadas foram obtidos nas aplicações de 6,0 kg m⁻² e 9,0 kg m⁻² de esterco de galinha, com aumento, em média, de 81,04 e 74,8 folhas e ganho de biomassa seca das mesmas de aproximadamente 60% e 54%, respectivamente, superiores em relação ao tratamento controle. Estes resultados são muito favoráveis para a produção vegetal de *D.purpurea* subsp. *heywoodii*, visto que os cardenólídeos estão mais concentrados nas folhas da planta (LUCKNER; WICHTEL, 2000).

O desenvolvimento do sistema radicular teve comportamento diferente das demais variáveis avaliadas, observou-se um decréscimo na biomassa seca de raiz com a aplicação da adubação de esterco de galinha. O tratamento controle produziu 12,48g de biomassa de raiz, enquanto que a maior média obtida com a adubação foi de 7,32 g (3 kg m⁻²). Dessa forma, a biomassa seca total apresentou maior acúmulo nas doses de 3,0; 6,0 e 9,0 kg m⁻², um incremento em torno de 60%, 64% e 70% na ordem das melhores doses citadas, quando comparado ao tratamento que não recebeu adubação

O uso do esterco avícola também modificou a distribuição de biomassa total pela planta. Houve uma maior alocação de biomassa da raiz para as folhas em todos os tratamentos que receberam a adubação orgânica, assim a maior relação raiz/parte aérea foi obtida no tratamento controle, no qual houve um direcionamento de biomassa para as raízes em

detrimento a parte aérea. De acordo com Mokany, Son e Prokushkin (2006), diversos fatores influenciam a razão raiz/parte aérea, incluindo a disponibilidade de nutrientes, havendo geralmente maior desenvolvimento radicular em plantas cultivadas em substratos que não recebem adubação quando comparados àqueles que recebem. Desse modo, sugere-se que o sistema radicular das plantas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* desenvolvidas com adubação necessitaram explorar uma área menor para absorção de nutrientes, principalmente N e P, já que estes estavam em quantidades significativas devido ao suplemento com a adubação orgânica. Enquanto que, àquelas que estavam na ausência de adubação necessitaram desenvolver seu sistema radicular para explorar uma área maior a fim de encontrar os nutrientes que estavam escassos, o que pode ter ocasionado uma maior alocação de biomassa da parte aérea para as raízes.

A análise química do esterco avícola apontou a presença de alguns nutrientes em concentração elevada, principalmente o nitrogênio e o fósforo. Costa et al. (2013) mencionaram que o ganho de biomassa evidenciado em espécies adubadas com esterco avícola pode estar relacionado as altas concentrações de N e P encontradas nesse tipo de adubo. Em geral, o nitrogênio é o elemento que a planta necessita em maior quantidade, pois está presente na constituição de diversas biomoléculas importante como o ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas, por isso quase sempre é um fator limitante, influenciando o crescimento da planta mais do que qualquer outro nutriente (SILVA et al., 2014). O fósforo atua na fotossíntese, na respiração, no armazenamento, na transferência de energia, na divisão celular, no crescimento das células e em vários outros processos da planta. Um dos problemas com esse elemento é a retenção e sua disponibilidade no solo, pois reagem com o cálcio e o ferro, para formar compostos insolúveis menos disponíveis. Por isso, deve-se fornecê-lo em grandes proporções à planta, para que ela possa absorver a quantidade necessária para se obter uma boa produção (LOPES, 1998; MALAVOLTA, 1989; SOARES et al., 2014). Assim, apesar do adubo utilizado apresentar uma concentração considerável de ferro, também fornece grandes quantidades de fósforo, o que pode ter superado o fenômeno de imobilização desse nutriente.

Tabela 4- Valores dos parâmetros de crescimento (BSF-biomassa seca de folha, BSR-biomassa seca de raiz, BST-biomassa seca total e R/PA-relação raiz/parte aérea), teores percentuais de cardenolídeos totais (CT), expressos em β -metildigitoxina e de produtividade de CT por planta de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas com diferentes doses de esterco de galinha.

Doses (kg m⁻²)	Número de folhas	BSF (g)	BSR (g)	BST (g)	R/PA	CT (%)±DP	Produtividade (g CT/planta)
0	52,75 d	22,25 c	12,48 a	34,73 c	0,57 a	0,92 ± 0,001 a	0,20 d
1,5	111,80 b	39,68 b	5,33 c	45,00 b	0,14 b	0,74 ± 0,002 d	0,29 c
3	113,25 b	42,71 b	7,32 b	50,03 a	0,16 b	0,67 ± 0,003 e	0,28 c
6	133,79 a	52,33 a	5,83 c	58,15 a	0,11 b	0,84 ± 0,006 b	0,44 a
9	127,58 a	48,25 a	5,77 c	54,02 a	0,12 b	0,80 ± 0,005 c	0,38 b
12	84,16 c	43,06 b	3,03 d	46,09 b	0,06 b	0,57 ± 0,011 f	0,21 d

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância.

Figura 5- Plantas de *D.purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas com diferentes doses de esterco de galinha. A- 0 kg m⁻², B- 1,5 kg m⁻², C- 3,0 kg m⁻², D- 6 kg m⁻², E- 9 kg m⁻², F- 12 kg m⁻².



A adubação orgânica representa uma fonte de nutrientes para as plantas (COSTA et al., 2013), e a nutrição se destaca como um fator importante para o crescimento de *D.lanata* e *D. purpurea* (BOSHART, 1937). De acordo com Heeger (1956) a quantidade de NPK recomendada para *D. purpurea* é de 60 kg N. ha⁻¹, 60 kg P₂O₅ . ha⁻¹ e 80 kg K₂O . ha⁻¹. A análise química do adubo utilizado no presente estudo demonstrou uma quantidade de 21 g N . Kg⁻¹, 20 g P₂O₅ . Kg⁻¹ e 7,3 g K₂O . Kg⁻¹, que para atender a necessidade recomendada necessitaria para cada vaso uma quantidade de esterco de 0,286; 0,3 e 1,10 kg . m², respectivamente. Assim, verificou-se que a espécie *D. purpurea* subsp. *heywoodii* precisa de uma quantidade superior que a recomendada para se obter uma máxima produção, já que os melhores resultados para biomassa foram observados nas doses de 3, 6 e 9 kg . m², uma quantidade de aproximadamente 10, 20 e 30 vezes a mais da dose indicada para N e P, na devida ordem.

Na maior dose utilizada (12 kg m⁻²) ocorreu mortalidade de algumas plantas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* sugerindo que essa concentração foi tóxica para a espécie. Isto pode estar relacionado com o aumento das dosagens, sendo que maiores teores de nutrientes disponíveis poderiam ocasionar um excesso de absorção pelas plantas. Esse excesso pode estar relacionado com a decomposição do material orgânico. O nitrogênio (N) é absorvido pela planta por fluxo de massa, sua alta concentração pela mineralização do material orgânico faz com que ele seja absorvido pela planta em altas quantidades, o que pode causar sintomas de toxidez (FACHINI; GALBIATTI; PAVANI, 2004) como desequilíbrio entre o crescimento da parte aérea em relação ao radicular e maior sensibilidade a doenças (MARCUSI; GODOY; BÔAS, 2004). Em cultivo *in vitro* com *Digitalis obscura*, sugeriu-se que altas concentrações de Cl⁻ causaram toxidez na espécie (GAVIDIA; PÉREZ-BERMÚDEZ, 1997). De acordo com Corrêa et

al. (2010), o acúmulo de biomassa pode ser favorecido com o aumento das dosagens de adubação orgânica, pela maior disponibilidade de nutrientes, ou pode ser afetado de forma negativa pelo excesso dos mesmos.

O efeito da adubação orgânica na produção de biomassa pelas plantas medicinais varia muito para cada espécie, e essa variação nas respostas pode ocorrer, provavelmente, pela influência do genótipo na absorção e utilização de nutrientes, e no teor deles presentes nos adubos orgânicos, que depende das fontes e dos locais de onde são provenientes (BRANT et al., 2010; BRITO et al., 2015; CORRÊA et al., 2010).

A metodologia empregada para o doseamento de cardenolídeos totais foi a mesma descrita para a validação do método analítico. Exceto o procedimento de extração, que empregou a sonicação a 70°C com 2 ciclos ininterruptos de 30 min, em virtude da baixa recuperação do nível alto de fortificação nos ensaio da exatidão. Houve diferença estatística entre as doses do adubo quanto aos teores médios de cardenolídeos totais e de sua produtividade em *D. purpurea* subsp. *heywoodii* (Tabela 1). As folhas de *D. purpurea* obtidas do tratamento controle (sem adubação) apresentaram maior teor médio de cardenolídeos totais com $0,924 \pm 0,001\%$, e dentre os tratamento que receberam adubação a dose de 6 kg m^{-2} foi a mais significativa ($0,843 \pm 0,006\%$). Comparando a produção do teor percentual de cardenolídeos totais entre o tratamento controle e o que recebeu a dose de 6 kg m^{-2} observou-se uma diferença de apenas 0,081% entre eles. No entanto, em termos de produtividade de cardenolídeos totais, o tratamento que recebeu 6 kg m^{-2} de esterco de galinha praticamente dobrou de produção ($0,44 \text{ g CT planta}^{-1}$), devido ao extraordinário ganho de biomassa seca das folhas.

A adição de nutrientes é geralmente empregada para aumentar a produção de biomassa, mas também influenciam a produção de diferentes metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Alguns trabalhos mostraram essa influência no teor de cardenolídeos. Hugentobler e Renwick (1995) estudaram o efeito da nutrição em *Erysimum cheiranthoides* e testaram três níveis de nitrogênio (0,2 N; 1N e 3N), verificando que a menor concentração de nitrogênio testada (0,2N) ocasionou uma melhor produção de cardenolídeos pela planta, ao mesmo tempo em que reduziu a produção de biomassa pela mesma, mostrando haver uma correlação entre essas duas variáveis. Pedrinho et al. (2007) também observaram as mesmas respostas na adubação nitrogenada em plantas de *Nerium oleander* L., o aumento na dose da adubação favoreceu a produção de biomassa, mas influenciou negativamente o teor de

cardenolídeo nesta espécie. Em *Digitalis lanata*, Tsao, Gomez e Chaubal (1960) observaram que aumento na concentração de K, através da adubação mineral, diminuiu a quantidade de cardenolídeos; e Poludjonnyj, Zizilin e Michailowa (1990) verificaram em campo que a adição de Mn^{2+} e MoO_4^{-2} com 10-14 dias antes da colheita aumentava a concentração de lanatosídeo C. E *Digitalis obscura* cultivada *in vitro* respondeu positivamente para o teor de cardenolídeos totais quando a concentração de macronutrientes no meio de cultura MS foi reduzida a 1/2 e 1/4 da sua concentração usual, mas esta condição não favoreceu o ganho de biomassa (GAVIDIA; PÉREZ-BERMÚDEZ, 1997b). O mesmo ocorreu com a duplicação e triplicação apenas do fósforo nesse meio de cultura (GAVIDIA; PÉREZ-BERMÚDEZ, 1997a). Dessa forma, observa-se uma possível relação negativa entre produção de biomassa e teor de cardenolídeos, quando testados doses de nutrientes.

Em *D. purpurea* subsp. *heywoodii* também observou-se as mesmas resposta, pois o tratamento que não favoreceu o crescimento da espécie (controle), observou-se maior teor de cardenolídeos. Esse resultado pode estar relacionado com a disponibilidade de nutrientes, pois geralmente o estresse nutricional resulta em aumento nas concentrações de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). No entanto, em se tratando de produtividade de cardenolídeos totais, a adubação orgânica foi favorável para a espécie, especialmente na dose de 6 kg m^{-2} .

4- CONCLUSÃO

Os resultados da validação analítica indicaram que o método espectrofotométrico é seletivo a 494 nm, por não apresentar absorção significativa em solução de leitura sem adição do reagente de coloração, sendo linear na faixa de 0,025 a 0,125 mg/mL, $R^2=0,9994$. O método é preciso, pois fornece desvios menores que 3,26%, exato com recuperação média de 98,05%, e robusto para o tempo de reação de 25 min e frente a pequenas variações no comprimento de onda de leitura.

Quanto a adubação, os resultados evidenciaram que para o cultivo de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* a adubação com 6 kg m^{-2} de esterco de galinha favorece a produtividade agrícola da espécie por apresentar, nessa condição, maiores acúmulos de biomassa seca de folhas e produtividade de cardenolídeos totais.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, N. P. et al. Cardiogenic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v. 99, p. 151-156, 2009.
- ALVES, I. A. B. dos S. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de Simarouba amara Aubl. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 39, n. 1, p. 37-47, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals**. 2002. Disponível em: <http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/slv_guidelines.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2017.
- BELL, F. K.; KRANTZ JUNIOR, J. C. Digitalis: IX., a spectroscopic study of baljet reaction for digitoxin and digitoxigenin. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 39, n. 6, p. 319-322, 1950.
- BERTOL, J. W. et al. Anti-herpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Res**, v. 92, p. 73-80, 2011.
- BOSHART, K. Düngungs versuche mit Fingerhut (*Digitalis purpurea* and *Digitalis lanata*). **Heil- und Gewürzpflanzen**, v. 17, p. 97-119, 1937.
- BRANT, R. da S. et al. Produção de biomassa e teor de óleo essencial de cidrão em função da adubação orgânica. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 111-114, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 899**, de 29 de maio de 2003. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132>. Acesso em: 7 fev. 2017.
- BRITO, A. U. et al. Produção de biomassa aérea, teor e rendimento de extrato das folhas de crajiru [*Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl.] em função de adubação orgânica em Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 444-453, 2015.
- CORRÊA, R. M. et al. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.
- COSTA, A. G. et al. Produção de biomassa, rendimento e composição química do óleo essencial de hortelã-pimenta usando diferentes fontes de adubação org. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 3, p. 202-210, maio/jun. 2013.

FACHINI, E.; GALBIATTI, J. A.; PAVANI, L. C. Níveis de irrigação e de composto de lixo orgânico na formação de mudas cítricas em casa de vegetação. **Eng. Agríc**, v. 24, n. 3, p. 578-588, 2004.

FERRAZ, E. O. et al. Organic systems in the growth and essential-oil production of the yarrow. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 1, p. 111-119, 2014.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistemas de análises de variância para dados balanceados:** programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras: Ed. UFLA, 2011.

GAVIDIA, I.; PEREZ-BERMODEZ, P. Cardenolides of *Digitalis obscura*: the effect of phosphate and manganese on growth and productivity of shoot-tip cultures. **Phytochemistry**, v. 45, n. 1, p. 81-85, 1997a.

GAVIDIA, I.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P. *Digitalis obscura cardenolides**: effect of macronutrient concentration and n source on growth and productivity of shoot-tip cultures. **Phytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 273-278, 1997b.

GHANEM, S. A. et al. *In vitro* propagation and cardiac glycosides content of *Digitalis lanata*. **International Journal of Academic Research**, v. 2, n. 6, p. 348-356, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

HEEGER, E. F. Handbush des Arznei- und Gewürzpflazenbaues - Bauernverlag, Berlin, 1956, S.377-380 (*Digitalis lanata* Ehrh), S. 380-388 (*Digitalis purpurea* L, Roter Fingerbut), S. 388 (andere *Digitalis*-Arten).

HUGENTOBLER, U.; RENWICK, J. A. A. Effects of plant nutrition on the balance of insect relevant cardenolides and glucosinolates in *Erysimum cheiranthoides*. **Oecologia**, v. 102, p. 95-101, 1995.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures:** methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96). London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

KOZERA, W.; MAJCHERCZAK, E. Content of macronutrients and values of mole ratios in leaves of the woolly foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh.) cultivated under differentiated mineral fertilization. **Journal of Elementology**, v. 16, n. 4, p. 555-565, 2011.

- KREIS, W.; HAUG, B.; YÜCESAN, B. Somaclonal variation of cardenolide content in Heywood's foxglove, a source for the antiviral cardenolide glucoevatromonoside, regenerated from permanent shoot culture and callus. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 41, p. 35-41, 2015.
- LOPES, A. S. **Manual internacional de fertilidade do solo**. 2. ed. Piracicaba: Instituto da Potassa e Fosfato, 1998.
- LUCKNER, M.; WICHTL, M. Digitalis. In: LUCKNER, M.; WICHTL, M. (Ed.). **Digitalis: geschichte, biologie, biochemie, chemie, physiologie, molekularbiologie, pharmakologie, medizinische anwendung**. Stuttgart: WVGmbH, 2000, 352 p.
- MAIA, S. S. S. et al. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo do bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Ciência Agrárias**, v. 3, n. 4, p. 327-331, 2008.
- MALAVOLTA, E. **ABC da adubação**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1989.
- MOKANY, K.; SON, R. J.; PROKUSHKIN, A. S. Critical analysis of root: shoot ratios in terrestrial biomes. **Global Change Biology**, v. 12, p. 84-96, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAVARRO, E. et al. Cardiovascular activity of a methanolic extract of *Digitalis purpurea* spp. *heywoodii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 437-42, 2000.
- NAVES, L. N. et al. Desenvolvimento de método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de lupeol em nanocápsulas poliméricas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 35, n. 3, p. 473-478, 2014.
- PATIL, J. G. et al. *In vitro* propagation and production of cardiogenic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 2379-2393, 2013.
- PEDRINHO, D. R. et al. Efeito da adubação nitrogenada na biomassa e no teor de glicosídeos cardioativos da ornamental *Nerium oleander* L. **Ensaio e Ci**, v. 11, n. 1, p. 59-66, 2007.
- POLUDJONNYJ, L. W.; ZIZILIN, A. N.; MICHAILOWA, M. A. Grinkewitsch, n.i. und lowkowa, m.j. einfluß der Mikrenhrsotoffe auf die Erträge und die Drogenqualität des Wollinger Fingerhut (*Digitalis lanata* Ehrh). **Drogenreport** 3, v. 4, p. 18-23, 1990.
- SILVA, M. V. T. da et al. Eficiência agrônômica e fisiológica na melancia fertirrigada com diferentes doses de nitrogênio e fósforo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 2, p. 264-269, 2014.

SOARES, M. M. et al. Nodulation and growth of soybean plants as a function of coating the seeds with phosphorous. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 5, p. 1438-1446, 2014.

SODRÉ, A. C. B. et al. Organic and mineral fertilization and chemical composition of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 40-44, 2012.

TSAO, D. P. N.; GOMEZ, L. M.; CHAUBAL, M. G. Effect of potassium, nitrogen, and phosphorus on the growth and glycoside accumulation in *Digitalis lanata* L. leaf yield and total glycosides. **J. Pharm. Sci**, p. 801-802, 1960.

ARTIGO 2

REGENERAÇÃO DE BROTOS, PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CARDENOLÍDEOS EM *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* INFLUENCIADOS POR REGULADORES DE CRESCIMENTO

RESUMO: *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* (Plantaginaceae) é considerada uma espécie medicinalmente importante devido a presença do cardenolideo glicoevatromonosideo, responsável por seu potencial antiviral ao herpes humano. Suas folhas é a principal fonte desse princípio ativo. Mas seu cultivo em campo apresenta alguns entraves, e uma alternativa para esta problemática seria o cultivo *in vitro*. Assim, o presente trabalho objetivou a propagação *in vitro* de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* em diferentes concentrações de citocininas no meio de cultura e seus efeitos na produção de cardenolídeos totais. Segmentos nodais de plântulas estabelecidas com 45 dias de idade foram inoculados em meio de cultura MS nas seguintes combinações e concentrações das citocininas BAP e TDZ: 0 mg/L (controle); 0,5 mg/L (0,25 + 0,25; 0,375 + 0,125; 0,125 + 0,375); 1,0 mg/L (0,5 + 0,5; 0,75 + 0,25; 0,25 + 0,75), 1,5 mg/L (0,75 + 0,75; 1,0 + 0,5; 0,5 + 1,0); e 2,0 mg/L (1,0 + 1,0; 1,5 + 0,5; 0,5 + 1,5). O delineamento foi o inteiramente casualizado. Aos 45 dias foram avaliadas as variáveis: número de brotos/explante, biomassa seca da parte aérea /explante, e teor e produtividade de cardenolídeos totais. Os tratamentos que emergiram maior número de brotos foram as concentração de BAP e TDZ de 0,5+0,5; 0,25+0,75 e 1+0,5, com média de 8,80; 10,37 e 10,60, brotos emergidos/explante, respectivamente. O acúmulo médio de biomassa seca foi favorecido na combinação de 0,375+0,125 de BAP + TDZ (0,366 g). Aumentos na concentração das citocininas proporcionaram o surgimento de brotos hiperidricificados e com aspecto amarelado. A ausência de citocininas ao meio proporcionou aos brotos um teor superior de cardenolídeos totais com média de $0,310 \pm 0,011\%$. Mas em termos de produtividade de cardenolídeos totais a combinação de 0,375+0,125 proporcionou melhores resultados (0,082 gCT/explante), visto esse tratamento produziu maior biomassa. Portanto, a adição das citocininas BAP e TDZ ao meio de cultura garante a regeneração *in vitro* de *D.purpurea* subsp. *heywoodii*, e quando utilizada na

combinação de 0,375 mg L⁻¹ de BAP + 0,125 mg L⁻¹ TDZ favoreceu o acúmulo de biomassa e produtividade de cardenolídeos totais pela espécie.

Palavras-chave: Plantaginacea, propagação *in vitro*, citocininas, espectrofotometria.

1- INTRODUÇÃO

O gênero *Digitalis* é representado por cerca de 20 espécies de plantas herbáceas bienal, perene e arbusto. São pertencentes à família Plantaginaceae e comumente utilizadas no tratamento de insuficiência cardíaca e arritmias, mas alguns trabalhos já relataram seu potencial como citotóxico e em doenças neurológicas (ALONSO et al., 2009; JIN et al., 2011; SHARMA; PURKAIT, 2012).

Entre as espécies do gênero, destaca-se a *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* conhecida popularmente como dedaleira, apresenta fluorescência com margem branca, por vezes rosa, com pontos roxos muito pequenos na parte interna, é endêmica de Portugal e Espanha (VALDÉS; TALAVERA; FERNANDÉZ-GALIANO, 1987), acumula em suas folhas os glicosídeos cardiotônicos (cardenolídeos) que são responsáveis pelo grande potencial farmacológico e propriedades bioativas da planta (CORDUK; AKI, 2010; PÉREZ-BERMÚDEZ et al., 2010). Na espécie se destaca a presença do cardenolídeo glicoevatromonosídeo, composto com grande potencial contra cepas do herpes-vírus humano (BERTOL et al., 2011; KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015; NAVARRO et al., 2000).

A principal fonte para obtenção desses compostos naturais bioativos, são as folhas de plantas de *Digitalis*, as quais são obtidas através do cultivo em campo das espécies (GHANEM et al., 2010; PATIL et al., 2013). Entretanto, o método convencional de propagação tem várias limitações para uma produção eficaz de material vegetal e cardenolídeos, como por exemplo, condições de clima e solo e dificuldades de germinação das sementes. Assim, o cultivo *in vitro* das espécies de *Digitalis* pode ser uma alternativa para estas problemáticas (ALONSO et al., 2009; LI et al., 2014; PATIL; AHIRE; NIKAM, 2012; VERMA et al., 2012, 2014), por proporcionar plantas geneticamente idênticas, rápida propagação, elevada quantidade de biomassa e alto teor de metabólitos secundários (SALES et al., 2002).

Diversos estudos vêm sendo realizados para verificar os efeitos dos reguladores de crescimento, presentes no meio de cultura, na relação entre diferenciação e morfogênese de explantes de *Digitalis*, bem como o teor de cardenolídeos sintetizados por eles (GHANEM et al., 2010). Combinações de reguladores de crescimento no meio de cultura favorecem o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* (JESUS et al., 2010). As citocininas são reguladores de crescimento que, quando adicionadas ao meio de cultura, intensificam a regeneração de brotos a partir de gemas axilares (FLORES et al., 2009). No entanto, o tipo e a concentração das citocininas utilizadas no meio de cultura são essenciais para o cultivo *in vitro* (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010). Em concentrações inadequadas, elas podem causar distúrbios fisiológicos característicos nas plantas, como redução no tamanho, encurtamento dos entrenós, hiperidrificação, inibição do enraizamento, entufamento e outro (FLORES et al., 2009). O BAP é a citocinina mais utilizada na micropropagação. O TDZ vem tornando-se eficaz na multiplicação de diversas espécies (FLORES et al., 2009; SILVA et al., 2008). A eficiência do BAP em relação a outras citocininas, principalmente as naturais como cinetina e 2ip, pode está relacionada ao fato de que os fitormônios naturais são metabolizados mais rapidamente que os reguladores sintéticos, além de ser o mais facilmente encontrado e com menor custo. Embora essas vantagens, algumas culturas podem apresentar diferentes sensibilidades na presença deste regulador de crescimento (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009; MANTOVANI et al., 1999). Enquanto que o TDZ, apesar de estimular a produção do etileno, podendo ocasionar senescência aos explantes, dependendo do tempo em que estes ficam expostos ao regulador; sua atividade tem sido melhor que outras citocininas derivadas da adenina, como o BAP (CARVALHO et al., 2011). Dessa forma, a combinação dessas duas citocininas pode ser fundamental, no sentido de aproveitar suas vantagens e superar as desvantagens.

Vários estudos com reguladores de crescimento em *Digitalis* já foram realizados, como em *Digitalis lanata* (FATIMA et al., 2009), *Digitalis thapsi* (CACHO et al., 1991), *Digitalis obscura* (VELA et al., 1991), *Digitalis trojana* (VERMA et al., 2012) e *Digitalis purpurea L.* (PATIL et al., 2013), no entanto, não há relatos na literatura de estudos envolvendo reguladores de crescimento com *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii*. Dessa forma, o presente trabalho objetivou a propagação *in vitro* de *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii* em diferentes concentrações de citocininas no meio de cultura e seus efeitos na produção de cardenolídeos totais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento dos explantes

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

Para o estabelecimento da espécie foram utilizadas sementes de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* adquiridas comercialmente (Jelitto Seeds[®], Alemanha). O material vegetal foi desinfestado em uma solução de hipoclorito de sódio a 50 % sob agitação por 10 minutos e, em câmara de fluxo laminar, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada. A seguir as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose e 0,6 % de ágar, PH ajustado para $\pm 5,7$, e posteriormente mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2 Indução de brotos

Plântulas estabelecidas com 45 dias de idade foram repicadas e o segmento nodal, utilizado como explante, inoculados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura MS com 3% de sacarose e 0,6 % de Ágar, e suplementado com as seguintes concentrações e combinações das citocininas BAP e TDZ:

Concentração (mg L ⁻¹)			
BAP	+	TDZ	Concentração total
-		-	0
0,25		0,25	
0,375		0,125	0,5
0,125		0,375	
0,5		0,5	
0,75		0,25	1,0
0,25		0,75	
0,75		0,75	
1,0		0,5	1,5
0,5		1,0	
1,0		1,0	
1,5		0,5	2,0
0,5		1,5	

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Sendo constituído de cinco repetições, com dois explantes por repetição. Aos 45 dias foram avaliadas as variáveis: número de brotos/explante, biomassa seca da parte aérea /explante, e teor e produtividade de cardenolídeos totais.

2.3 Análise quantitativa de cardenolídeos

Extração: A extração de cardenolídeos seguiu o protocolo relatado por Kreis, Haug e Yücesan (2015), com modificações. Folhas secas em estufa ventilada a 70°C foram pulverizadas a pó fino em micromoinho de facas. Após incubação de 100 mg de folhas pulverizadas com 1 mL de etanol a 70% (v/v) em banho de ultrassom por 30 min a 70 °C, o extrato foi microcentrifugado a 13000 g por 10 min. Ao sobrenadante foram adicionados 300 µl de acetato de chumbo a 15% (p/v), em seguida, microcentrifugado. Após a remoção do resíduo de acetato de chumbo, 200 µL de solução aquosa de fosfato monossódico (Na₂HPO₂) a 10% (p/v) foram adicionados ao sobrenadante, e, em seguida, novamente microcentrifugado. Ao sobrenadante coletado foi adicionado 1 mL de clorofórmio:isopropanol (3: 2 v/v) e centrifugado a 13000 g durante 5 min. A fase inferior foi transferida para um balão e, então rotaevaporada até *secura*.

Análise quantitativa de cardenolídeos: O doseamento de cardenolídeos totais foi realizado por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, empregando método analítico validado no artigo 1 dessa tese. O método consistiu em adicionar ao resíduo da extração um volume de 2 mL de

metanol, seguido de sonicação até completa dissolução (1-2 min). A solução metanólica foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e em seguida, adicionou-se 5 mL de reagente de Baljet (95 mL de ácido pícrico a 1% + 5 mL de solução aquosa de NaOH a 10%), completando-se o volume com metanol. Após 20 minutos de reação, as leituras a 494 nm foram determinadas, frente ao branco. O branco foi obtido transferindo-se 5 mL de reagente de Baljet para um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com metanol.

Para cada solução elaborou-se uma solução de compensação misturando-se 2 mL de solução metanólica da amostra obtida conforme descrito anteriormente, e diluindo para 10 mL com metanol. As leituras das absorções a 494 nm das soluções de compensação foram mensuradas frente ao metanol. O valor de absorbância obtido para a solução de compensação foi então subtraído da leitura obtida para a amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O teor total de cardenólídeos foi mensurado empregando-se a equação da reta, elaborada através de duas curvas analíticas. A partir da equação, chegou-se a seguinte fórmula para o cálculo do teor de cardenólídeos expressos em β -metildigitoxina:

$$\% \text{ CT} = 0,133 (A_{\text{corrigida}} - 0,0619) / m \text{ (g)}$$

Onde: $A_{\text{corrigida}}$ = absorvância a 494 nM corrigida

m = massa do material vegetal em grama

2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas ao teste de Skott-Knott, ambas a 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011) foi utilizado para o processamento dos dados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Multiplicação de brotos e produção de biomassa e cardenólídeos

Os resultados das concentrações e combinações de citocininas no crescimento e produção de cardenólídeos de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* estão representadas na tabela 1. Todos os

tratamentos que receberam BAP e TDZ foram superiores em relação ao tratamento controle na multiplicação de brotos. No entanto, considerando a concentração total, na menor dose ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) nenhum tratamento emitiu números consideráveis de brotos, mas o aumento das concentrações totais para a faixa de 1,0 a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ observaram-se aumento das emissões de brotos para determinadas combinações. Os tratamentos que apresentaram resultados significativamente mais elevados foram com as combinações de BAP + TDZ de 0,5+0,5; 0,25+0,75; 1,0+0,5; e, 0,5+1,5; com variação média entre 8,80 a 10,6 brotos emergidos/explante. No tratamento que não foi adicionado citocininas ao meio de cultura não ocorreu multiplicação de brotos, onde cada explante emitiu em média 1 broto. As respostas na multiplicação de brotos não seguiram uma tendência com o aumento da concentração total de BAP e TDZ, mas se mostrou dependente da concentração individual de cada citocinina.

Na menor concentração utilizada, a combinação de 0,375+0,125 proporcionou maior produção de biomassa (0,366 g), que apesar de não estar entre os melhores tratamentos na multiplicação de brotos, emitiram 7,27 brotos/explante. Enquanto que, os tratamentos que proliferaram mais brotos não foram eficientes para o acúmulo de biomassa. Esses resultados podem estar relacionados com a presença do TDZ, visto que este regulador possui alta atividade citocínica. Este resultado indica que esse regulador deve ser usado em baixas concentrações, já que quando utilizado em concentrações usuais de outras citocininas, poderá inibir o crescimento da planta, além de estimular a produção de etileno. O etileno é uma substância que pode estar relacionada com o fenômeno da hiperidricidade, uma desordem fisiológica causada por excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura, que tem como uma das características a proliferação de altas taxas de brotações com baixa qualidade, diminuição na massa seca, entre outras (MANTOVANI et al., 1999; SILVA et al., 2014; VACONCELOS et al., 2012).

Essa desordem fisiológica foi observada em brotos de *D.purpurea* subsp. *heywoodii*. Na figura 1 é possível perceber a diferença da qualidade das brotações desenvolvidas em meio sem e com a adição de citocininas, pois brotos emergidos na ausência de BAP e TDZ apresentaram as folhas com coloração verde mais escura e forma oval-oblonga, típico das espécies de *Digitalis*. Enquanto que brotos desenvolvidos em meio suplementado com as citocininas, tiveram coloração verde mais clara e, a partir que a concentração foi aumentando, essa característica foi acentuando-se até o aspecto amarelado; suas folhas apresentaram forma mais espatulada, e a maioria dos brotos hiperidrificaram.

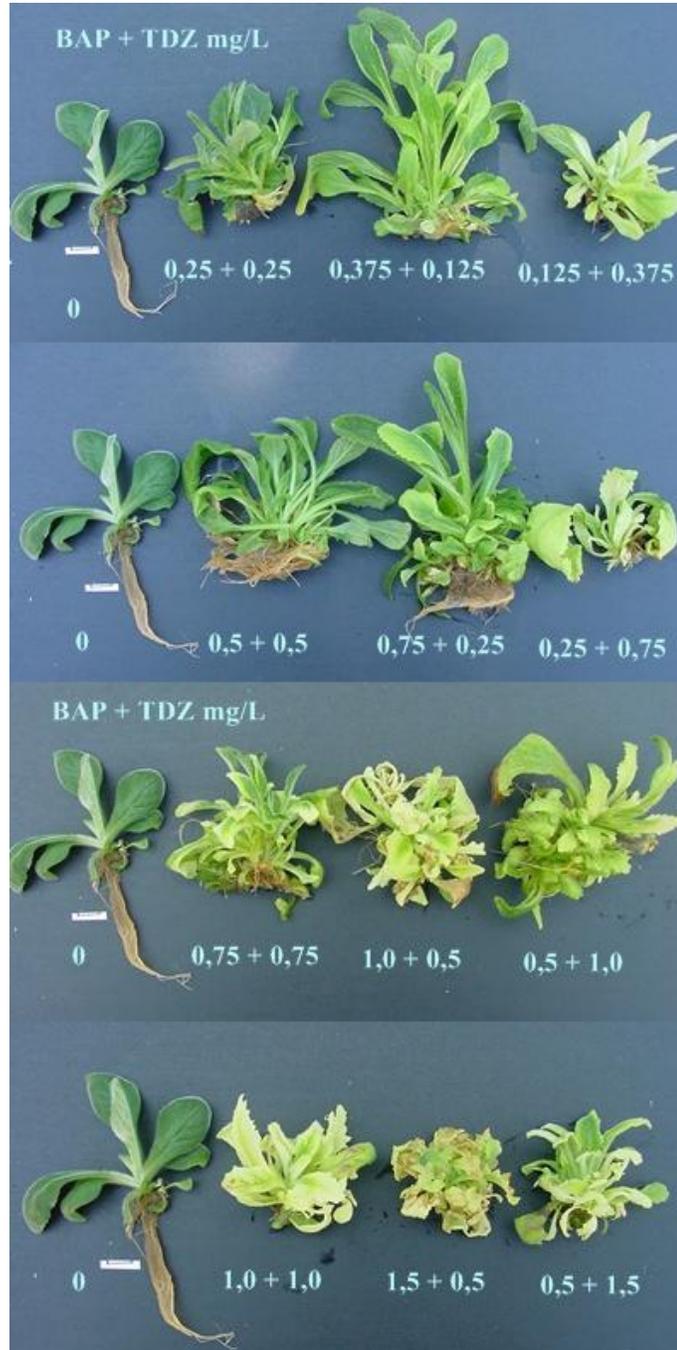
Diversos trabalhos têm demonstrado que dentre as citocininas utilizadas para a multiplicação de brotos, o BAP é o que tem mostrado melhores resultados em espécies de *Digitalis* (FÁTIMA et al., 2009). Mas o TDZ surgiu como um regulador de crescimento eficaz para muitas espécies, dentre elas as herbáceas (SILVA et al., 2008). Verma et al. (2012) verificaram que o BAP não foi eficaz na multiplicação de *Digitalis trojana*, enquanto que o TDZ foi a citocinina mais eficiente. Em *Digitalis purpurea* L. o BAP apresentou resposta superior ao TDZ na emissão de brotos nos três tipos de explante testados: nodal, internodal e foliar, assim como o maior peso seco observado no estudo (PATIL et al., 2013). Em *D.purpurea* subsp. *heywoodi* foi feito estudos preliminares utilizando estas citocininas de forma isolada, mas os resultados não foram satisfatórios, por isso optou-se em usá-las de forma combinada.

Tabela 1- Efeito de diferentes concentrações e combinações das citocininas BAP + TDZ no número de brotos (NB), na biomassa seca da parte aérea (BSPA), teor (CT) e produtividade de cardenolídeos totais em *D.purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas *in vitro*.

Concentração (mg L ⁻¹)			NB/explante	BSPA (g/explante)	CT (%) ± DP	Produtividade (gCT /explante)
Concentração total	BAP	+ TDZ				
0	-	-	1,0 d	0,178 d	0,310 ± 0,011 a	0,052 b
0,5	0,25	0,25	3,60 c	0,222 c	0,204 ± 0,004 c	0,045 b
	0,375	0,125	7,27 b	0,366 a	0,225 ± 0,009 b	0,082 a
	0,125	0,375	2,86 d	0,189 d	0,154 ± 0,006 d	0,029 c
1,0	0,5	0,5	8,80 a	0,313 b	0,135 ± 0,015 e	0,042 b
	0,75	0,25	8,32 b	0,217 c	0,132 ± 0,007 e	0,029 c
	0,25	0,75	10,37 a	0,287 b	0,077 ± 0,001 h	0,022 c
1,5	0,75	0,75	7,10 b	0,280 b	0,111 ± 0,010 f	0,031 c
	1,0	0,5	10,6 a	0,297 b	0,061 ± 0,003 i	0,018 d
	0,5	1,0	7,20 b	0,290 b	0,065 ± 0,001 i	0,019 d
2,0	1,0	1,0	5,50 c	0,165 d	0,072 ± 0,003 h	0,012 d
	1,5	0,5	6,90 b	0,248 c	0,094 ± 0,009 g	0,023 c
	0,5	1,5	9,13 a	0,243 c	0,042 ± 0,003 j	0,010 d

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância.

Figura 1- Multiplicação de brotos de *D.purpurea* subsp. *heywoodii* em diferentes concentrações e combinações de BAP + TDZ.



A suplementação com citocininas para a regeneração de brotos de *D.purpurea* subsp. *heywoodii* reduziu a produção de cardenólídeos *in vitro* (Tabela 1). Brotos desenvolvidos em

meio ausente de citocininas apresentaram melhores teores de cardenólídeos totais, com produção média de $0,310 \pm 0,011\%$ em cada 100 mg de folhas secas, uma diferença de apenas 0,085% a mais da concentração que apresentou melhor produção do princípio ativo ($0,375 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,125 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ). No entanto, essa concentração ($0,375 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,125 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ) apresentou maior produtividade, com média de 0,082 g de cardenólídeos totais por cada explante, visto que foi o tratamento que produziu maior biomassa.

Patil et al. (2013) estudando o efeito de regulares de crescimento em *Digitalis purpurea* L., na produção de digitoxina e digoxina, principais cardenólídeos da espécie, verificaram que as auxinas isoladas promoveram o acúmulo desses cardenólídeos, mas a combinação com citocininas, dentre elas o BAP ou TDZ, diminuiu a eficiência da espécie em produzir os cardenólídeos. Vela et al. (1991) suplementaram o meio de cultura com a combinação de BAP e a auxina ANA e verificaram um alto grau de hiperidricidade dos brotos de *Digitalis obscura*, sugerindo que esta desordem poderia ter afetado negativamente a capacidade biossintética da espécie, ocasionando uma baixa produção dos cardenólídeos. Em *D.purpurea* subsp. *heywoodii* também ocorreu hiperidrificação na maioria dos brotos que se desenvolveram em meio suplementado com altas concentrações citocininas, talvez por essa razão, esses tratamentos não tiveram respostas positivas para produção de cardenólídeos.

Esses resultados indicaram que a adição das citocininas BAP e TDZ ao meio de cultura foi decisiva na regeneração de brotos, e quando utilizada em concentração e combinação adequada favorece o acúmulo de biomassa e a produção de cardenólídeos em *D. purpurea* subsp. *heywoodii*.

4 CONCLUSÃO

A suplementação do meio de cultura MS com $0,375 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $0,125 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ proliferam brotos de *D.purpurea* subsp. *heywoodii* com eficiente produção de biomassa e produtividade de cardenólídeos totais.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, N. P. et al. Cardiotoxic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v. 99, p. 151-156, 2009.
- BERTOL, J. W. et al. Anti-herpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Res**, v. 92, p. 73-80, 2011.
- CACHO, M. et al. Morphogenesis in leaf, hypocotyl and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, p. 117-123, 1991.
- CARVALHO, D. C. de et al. Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 108-114, jan./fev. 2011.
- CORDUK, N.; AKI, C. Direct shoot organogenesis of *Digitalis trojana* Ivan., an endemic medicinal herb of Turkey. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 1587-1591, 2010.
- FATIMA, Z. et al. Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates. **Turk J Bo**, v. 33, p. 393-405, 2009.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistemas de análises de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras: Ed. UFLA, 2011.
- FLORES, R. et al. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 11, n. 3, p. 292-299, 2009.
- GHANEM, S. A. et al. *In vitro* propagation and cardiac glycosides content of *Digitalis lanata*. **International Journal of Academic Research**, v. 2, n. 6, p. 348-356, 2010.
- JESUS, A. M. S. et al. Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia**, v. 1125, p. 431-436, 2010.
- JIN, Q. et al. Phenylethanoid Glycosides from *Digitalis purpurea* L. **Korean Chem. Soc**, v. 32, n. 5, p. 1721-1724, 2011.
- KREIS, W.; HAUG, B.; YÜCESAN, B. Somaclonal variation of cardenolide content in Heywood's foxglove, a source for the antiviral cardenolide glucoevatromonoside, regenerated from permanent shoot culture and callus. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 41, p. 35-41, 2015.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, mar./abr. 2010.

- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.
- LI, Y. et al. A stable and efficient *Agrobacterium tumefaciens*: mediated genetic transformation of the medicinal plant *Digitalis purpurea* L. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 172, p. 1807-1817, 2014.
- MANTOVANI, N. C. et al. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAVARRO, E. et al. Cardiovascular activity of a methanolic extract of *Digitalis purpurea* spp. *heywoodii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 437-42, 2000.
- PATIL, J. G.; AHIRE, M. L.; NIKAM, T. D. Influence of plant growth regulators on *in vitro* seed germination and seedling development of *Digitalis purpurea* L. **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 2012.
- PATIL, J. G. et al. *In vitro* propagation and production of cardiogenic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 2379-2393, 2013.
- PÉREZ-BERMÚDEZ, P. et al. *Digitalis purpurea* P5 b R2 , encoding steroid 5 b -reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis. **New Phytologist**, v. 185, n. 2009, p. 687-700, 2010.
- SALES, E. et al. Plant hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82 . 139 induce efficient plant regeneration in the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. **Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 9-16, 2002.
- SHARMA, A.; PURKAIT, B. Identification of medicinally active ingredient in ultradiluted *Digitalis purpurea*: fluorescence spectroscopic and cyclic-voltammetric study. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2012, p. 1-5, Jan. 2012.
- SILVA, T. dos S. et al. Multiplicação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 13, p. 1-6, 2014.
- SILVA, T. dos S. et al. Multiplicação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 13, n. 1957, p. 1-6, 2008.
- VACONCELOS, A. G. V. de et al. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v. 42, p. 837-844, 2012.

VALDÉS, B.; TALAVERA, S.; FERNANDÉZ-GALIANO, E. **Flora vascular de Andalucía Occidental 2**. 2. ed. Barcelona: Ketres, 1987.

VELA, S. et al. Micropropagation of juvenile and adult *Digitalis obscura* and cardenolide content of clonally propagated plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 27, p. 143-146, July 1991.

VERMA, S. K. et al. Direct somatic embryogenesis from hypocotyl segments of *Digitalis trojana* Ivan and subsequent plant regeneration. **Industrial Crops & Products**, v. 40, p. 76-80, 2012.

VERMA, S. K. et al. Embryogenesis, plant regeneration and cardiac glycoside determination in *Digitalis ferruginea* subsp. *ferruginea* L. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 119, p. 625-634, 2014.

ARTIGO 3

DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUZ NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE CARDENOLÍDEOS EM *Digitalis purpurea* SUBSP. *heywoodii* CULTIVADAS *IN VITRO*

RESUMO: *D.Purpurea* subs. *heywoodii* (Plantaginaceae) é uma planta medicinal produtora dos glicosídeos cardiotônicos, com destaque ao glicoevatromonosídeo, fármaco que atua contra o vírus do herpes humano. O cultivo tradicional em campo limita a produção da espécie. O cultivo *in vitro* pode ser uma alternativa para esta problemática. A luz é um dos fatores chave que altera o desenvolvimento das plantas. Objetivou-se avaliar diferentes condições de luz do cultivo *in vitro* e seus efeitos no crescimento e produção de cardenolídeos totais em *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii*. Dessa forma, avaliaram-se as seguintes condições de luz: intensidade da luz (20, 50, 78, 102 e 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ LEDs), qualidade da luz (controle – fluorescente com 39 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e as LEDs branca, verde, azul (A), vermelha (V), 2V:1A, 1V:2A, 1V:1A) e o choque de luz (controle, azul, vermelha, 20 e 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Aos 45 dias foram avaliadas as variáveis: número de brotos/explante; biomassas secas da parte aérea, raízes e total/plântula; e, teor e produtividade de cardenolídeos totais/plântula. Os acúmulos de biomassas secas da parte aérea e total aumentaram com o aumento da densidade de fluxo de fótons, mas foi na condição de 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que ocorreram as melhores respostas para todas as variáveis analisadas. Igualmente para as lâmpadas fluorescentes branca, quando comparadas a LEDs com diferentes comprimentos de ondas, mas as combinações de 1V:2A e 1V:1A favoreceram a síntese de cardenolídeos totais. Choque de luz teve impacto positivo com a LED branca de 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para todos os parâmetros biométricos avaliados. Portanto, intensidade e choque com densidade de fluxo de fótons de 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionou melhor crescimento e produção de cardenolídeos pela espécie; e Lâmpadas fluorescentes branca-fria foram melhores para o crescimento dos brotos, mas as combinações de 4V:10A e 7V:7A proporcionaram melhor teor de cardenolídeos totais.

Palavras-chave: Plantaginaceae. Planta medicinal. LEDs. Fluxo de fótons.

1- INTRODUÇÃO

As espécies de *Digitalis* (Plantaginaceae) são as principais fontes de cardenolídeos usados em medicina. A contratilidade cardíaca é aumentada e a frequência cardíaca é controlada em pacientes com certas condições cardíacas. Estudos mais recentes sugerem outros usos medicinais dos cardenolídeos, como em quimioterapia de alguns tipos de câncer e no controle do herpes-vírus humano Tipos 1 e 2 (BERTOL et al., 2011; KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015; LOPEZ-LAZARO et al., 2003; NAVARRO et al., 2000).

Estes compostos apresentam estrutura química complexa com vários centros quirais, o que inviabiliza sua síntese em escala industrial. Dessa forma, eles são obtidos de folhas de espécies de *Digitalis*, cuja concentração varia de 0,5% a 1,5% (LUCKNER; WICHTL, 2000). Portanto, a principal obtenção dos cardenolídeos ainda é através do cultivo em campo da espécie. No entanto, as condições de clima, solo e baixa taxa de germinação das sementes são fatores do cultivo tradicional que limitam as produções de biomassa vegetal e glicosídeos cardiotônico pelas espécies de *Digitalis* (ALONSO et al., 2009; VERMA et al., 2016).

Desse modo, e devido ao interesse comercial, vários estudos vêm sendo realizados com o cultivo *in vitro* de espécies de *Digitalis*, por ser considerado um processo biotecnológico altamente viável, e proporcionar plantas geneticamente idênticas, rápida propagação, elevada quantidade de biomassa e alto teor de metabólicos secundários (CORDUK; AKI, 2010; GHANEM et al., 2010; PATIL et al., 2013; SALES et al., 2002).

A luz é um dos fatores chave que altera o desenvolvimento das plantas, devido seu impacto sobre a morfogênese. Diferentes regimes de luz causam mudanças fisiológicas e morfológicas nas plantas, e seu potencial vai depender de sua adaptação a essas condições (RESENDE et al., 2011). Comumente na micropropagação emprega-se lâmpadas fluorescentes branca-fria nas salas de crescimento como fonte de luz, mas nos últimos anos o uso de diodos emissores de luz (LEDs) vem sendo largamente utilizados nesse tipo de cultivo por possuírem baixa produção de calor, longo período de vida, comprimento de onda específico e tamanho reduzido. Visto que, a qualidade da luz como o comprimento de onda específico, a densidade de fluxo de fótons e o fotoperíodo influenciam a morfogênese das plantas cultivadas *in vitro* (ERIG; SCHUCH, 2005; ROCHA et al., 2010).

Estudos tem relatado uma correlação positiva entre a condição de luz *in vitro*, teor de clorofila e produção de cardenólídeos em *D. purpurea* e *D. lanata* (EISENBEIß; KREIS; REINHARD, 1999; HAGIMORI; MATSUMOTO; OBI, 1982; OHLSSON; BJORK; GATENBECK, 1983), no entanto não há estudos para *D. purpurea* L. subsp. *heywoodii*. assim, com o presente estudo objetivou-se avaliar diferentes condições de luz do cultivo *in vitro* e seus efeitos no crescimento e produção de cardenólídeos totais em *Digitalis purpurea* subsp. *heywoodii*.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento dos explantes

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

Para o estabelecimento da espécie foram utilizadas sementes de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* adquiridas comercialmente (Jelitto Seeds[®], Alemanha). O material vegetal passou por um processo de assepsia em uma solução de hipoclorito de sódio a 50 % sob agitação por 10 minutos e, em câmara de fluxo laminar, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada. A seguir as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose, 0,6 % de Agar e pH ajustado para $\pm 5,8$. A cultura foi mantida em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ utilizando lâmpadas fluorescentes branca-fria.

2.2 Crescimento *in vitro* e produção de cardenólídeos

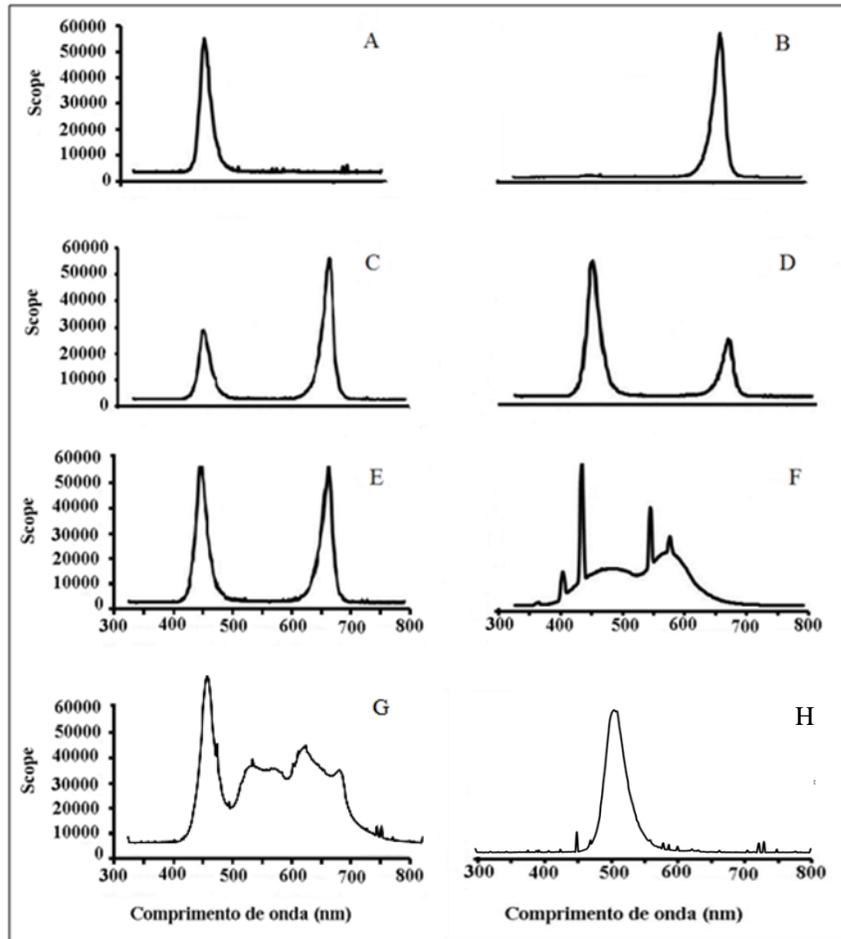
Para avaliar o efeito de diferentes condições de luz no crescimento vegetativo e produção e acúmulo de cardenólídeos totais *in vitro*, foram conduzidos três experimentos distintos. Para isto, plântulas com 45 dias de idade foram repicadas e o segmento nodal inoculados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura MS, nas mesmas condições do estabelecimento. A seguir o material foi mantido em salas de crescimento com 16 horas de luz e temperatura de 25 ± 2 °C nas condições de luminosidade descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Condições de luminosidade dos três experimentos de regimes de luz realizados para avaliar o acúmulo de biomassa seca e cardenolídeos totais em plântulas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii*.

Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Intensidade de luz (LED Branca - $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Qualidade de luz	Choque de luz
20	Fluorescente - controle ($39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Fluorescente - controle ($39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
57	LED Branca	LED Azul
78	LED Verde	LED Vermelha
102	LED Azul	LED Branca ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
139	LED Vermelha	LED Branca ($139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
-	LED 2 vermelhas:1 azul (2V:1A)	
-	LED 1 vermelha: 2 azuis (1V:2A)	-
-	LED 1 vermelha: 1 azul (1V:1A)	-

As densidades de fluxo de fótons dos diodos emissores de luz (LED) (TECNAL© Piracicaba, Brasil) branca, e as monocromáticas azul, vermelha e verde empregadas nos experimentos foram de $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A lâmpada fluorescente (controle) empregada nos experimentos 2 e 3 foi do tipo branca fria (Osram©, Brasil). As densidades de fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) das lâmpadas LEDs e fluorescente foram aferidas através do medidor PRO CHECK + PAR PHOTON FLUX SENSOR, modelo QSO-S (DECAGON DEVICES – Pullman-Washington – USA). No que tange, a distribuição espectral dos LEDs e da lâmpada fluorescente, os perfis espectrais no UV_{vis} estão representados na Figura 1. Os perfis espectrais no UV_{vis} foram aferidos com um espectrômetro portátil SPECTRA PEN Z850 (Qubit Systems-Kingston, Ontario-USA).

Figura 1 – Perfis espectrais no UV_{vis} das fontes artificiais de luminosidade empregadas nos experimentos de intensidade, qualidade e choque de luz realizados para avaliar o crescimento e o acúmulo de cardenólídeos totais em plântulas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii*. A= azul, B=vermelho, C = 1 azul: 2 vermelhos, D= 2 azuis:1 vermelho, E=1 azul:1 vermelho, F= fluorescente, G= branco, H = verde.



Para o experimento 3 (choque de luz), as plântulas foram mantidas sob lâmpadas fluorescentes com densidade de fluxo de fótons de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (controle) por 30 dias, após esse período ficaram por mais 15 dias nas condições descritas na tabela 1.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Para o experimento 1 (intensidade de luz) utilizou-se cinco repetições, com cinco frascos por repetição contendo três explantes. Enquanto, os demais experimentos foram constituídos de quatro repetições com quatro frascos por repetição contendo dois explantes. Aos 45 dias foram avaliadas as variáveis: número

de brotos/explante; biomassas secas da parte aérea, raízes e total/plântula; e, teor e produtividade de cardenolídeos totais/plântula.

As determinações das biomassa secas nos experimentos foram realizadas com amostras desidratadas em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C, até peso constante, as quais foram expressas g planta⁻¹.

2.3 Doseamento de cardenolídeos totais

Extração: A extração de cardenolídeos seguiu o protocolo relatado por Kreis, Haug e Yücesan (2015), com modificações. Folhas secas em estufa ventilada a 70°C foram pulverizadas a pó fino em micromoinho de facas. Após incubação de 100 mg de folhas pulverizadas com 1 mL de etanol a 70% (v/v) em banho de ultrassom por 30 min a 70 °C, o extrato foi microcentrifugado a 13000 g por 10 min. Ao sobrenadante foram adicionados 300 µL de acetato de chumbo a 15% (p/v), em seguida, microcentrifugado. Após a remoção do resíduo de acetato de chumbo, 200 µL de solução aquosa de fosfato monossódico (Na₂HPO₂) a 10% (p/v) foram adicionados ao sobrenadante, e, em seguida, novamente microcentrifugado. Ao sobrenadante coletado foi adicionado 1 mL de clorofórmio:isopropanol (3: 2 v/v) e centrifugado a 13000 g durante 5 min. A fase inferior foi transferida para um balão e, então rotaevaporada até *secura*.

Análise quantitativa de cardenolídeos: O doseamento de cardenolídeos totais foi realizado por espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta. O método analítico validado (Artigo 1), consistiu em adicionar ao resíduo da extração um volume de 2 mL de metanol, seguido de sonicação até completa dissolução (1-2 min). A solução metanólica foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e em seguida, adicionou-se 5 mL de reagente de Baljet (95 mL de ácido pícrico a 1% + 5 mL de solução aquosa de NaOH a 10%), completando-se o volume com metanol. Após 20 minutos de reação, as leituras a 494 nm foram determinadas, frente ao branco. O branco foi obtido transferindo-se 5 mL de reagente de Baljet para um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com metanol.

Para cada solução elaborou-se uma solução de compensação misturando-se 2 mL de solução metanólica da amostra com suficiente para de metanol para completar o volume de 10 mL. As leituras das absorções a 494 nm das soluções de compensação foram mensuradas frente

ao metanol. O valor de absorvância obtido para a solução de compensação foi então subtraído da leitura obtida para a amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O teor total de cardenolídeos foi mensurado empregando-se a equação da reta, elaborada através de duas curvas analíticas. A partir da equação, chegou-se a seguinte fórmula para o cálculo do teor de cardenolídeos expressos em β -metildigitoxina:

$$\% \text{ CT} = 0,133 (A_{\text{corrigida}} - 0,0619) / m \text{ (g)}$$

Onde: $A_{\text{corrigida}}$ = absorvância a 494 nM corrigida

m = massa do material vegetal em grama

2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas ao teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011) foi utilizado para o processamento dos dados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Intensidade de luz

Os acúmulos de biomassa e cardenolídeos totais *in vitro* foram significativamente influenciados pela intensidade de luz (Tabela 2). Nota-se que os acúmulos de biomassas secas da parte aérea e total aumentaram com o aumento da densidade de fluxo de fótons. Segmentos nodais desenvolvidos na maior intensidade luminosa ($139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) acumularam maiores biomassas secas da parte aérea (0,085 g) e total (0,115 g), como mostra a figura 2. Independente do regime luminoso, os segmentos nodais emitiram apenas 1 broto/explante.

Tabela 2- Parâmetros de crescimento (BSF-biomassa seca de folha, BSR-biomassa seca de raiz e BST-biomassa seca total), teor e produtividade de cardenólídeos totais (CT) em plântulas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas *in vitro* sob diferentes regimes de intensidade luminosa.

Intensidades de luz $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	BSPA	BSR	BST	Teor de CT\pmDP	Produtividade
	g planta⁻¹			%	g CT/plântula
20	0,041 e	0,010 d	0,051 d	0,230 \pm 0,001 e	0,009 d
57	0,057 d	0,020 c	0,077 c	0,285 \pm 0,018 d	0,016 c
78	0,065 c	0,024 b	0,090 b	0,395 \pm 0,016 b	0,026 b
102	0,075 b	0,017 c	0,090 b	0,340 \pm 0,014 c	0,025 b
139	0,085 a	0,030 a	0,115 a	0,488 \pm 0,009 a	0,042 a

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. BSPA: biomassa seca da parte aérea; BSR: biomassa seca de raízes; BST: biomassa seca total; CT: cardenólídeos totais; DP: Desvio padrão ($n = 3$).

Figura 2.- Brotos de *D.purpurea* subsp. *heywoodii* desenvolvidos em diferentes intensidades de luz.



As plantas apresentam comportamentos múltiplos nos aspectos morfofisiológicos quanto à sua adaptabilidade em níveis de radiação (DAS, 2004). Assim, a produtividade e o acúmulo de biomassa são dependentes da quantidade total de luz recebida durante a fase de crescimento, em que água e nutrientes são suficientes (ORT; BAKER, 1988).

Quanto ao acúmulo de biomassa de raízes, este também foi maior na densidade de fluxo de fótons de $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0,030 g). Conforme Claussen (1996), plantas com capacidade de suportar taxas fotossintéticas elevadas sob condições de alta transpiração, normalmente possuem sistemas radiculares mais desenvolvidos, pois podem demandar maior quantidade de água e nutrientes. Uma vez que plântulas com sistema radicular mais desenvolvido tem a capacidade de maior absorção de nutrientes, isso pode explicar o maior acúmulo de biomassa da parte aérea e, conseqüentemente, a total.

Similarmente aos parâmetros biométricos, o tratamento com maior densidade de fluxo de fótons também proporcionou maiores produção e acúmulo de cardenólídeos totais (CT). Nesse

tratamento, as médias do teor e da produtividade de cardenolídeos totais foram de 0,488% e 0,042 g de CT/plântula, respectivamente. Assim, como para o acúmulo de biomassas secas da parte aérea e total, o teor e a produtividade de CT também apresentaram respostas crescentes com o aumento da intensidade de luz (Tabela 1).

Diversos autores demonstraram a importância da luz no acúmulo de cardenolídeos em diferentes culturas *in vitro* de *D. lanata* L. ou *D. purpurea* L. (EISENBEIß; KREIS; REINHARD, 1999; HAGIMORI; MATSUMOTO; OBI, 1982; KUBERSKI et al., 1984; OHLSSON; BJORK; GATENBECK, 1983). Hagimori, Matsumoto e Obi (1982) demonstraram o acúmulo de digitoxina em brotos adventícios oriundos de calos verdes de *D. purpurea* cultivados sob luz fluorescente foi maior que naqueles cultivados no escuro. Eisenbeiß, Kreis e Reinhard (1999) demonstraram que a cultura de brotos de *D. lanata* por 6 semanas no escuro diminuiu o tamanho da folha e alterou o perfil metabólito de produção dos cardenolídeos. A transferência dessa cultura para luz branca LED por 4 semanas aumentou o tamanho da folha e os níveis de cardenolídeos na *D. lanata*.

Ohlsson, Bork e Gatenbeck (1983) testaram o teor dos cardenolídeos digitoxina e digoxina em *Digitalis lanata* cultivadas *in vitro* sob condições de luz e escuro, e verificaram que o teor de digitoxina foi maior quando na presença de luz, e que este fator não afetou a produção de digoxina, mostrando que a influência da luz é diferente para cada cardenolídeo.

O principal sítio de produção e acúmulo de cardenolídeos em *Digitalis* são as folhas, especialmente no mesófilo foliar, onde ocorrem os processos fotossintéticos. A característica distintiva das células do mesófilo se deve a presença dos cloroplastos, que realizam todo o processo fotossintético (GUREL et al., 2011; WEILER; ZENK, 1976). A luz fornece a energia requerida para a fotossíntese, participando ativamente dos processos metabólicos das plantas e do cultivo *in vitro* (AFREEN; ZOBAYED; KOZAI, 2005; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). No entanto, conforme demonstrado por Hagimori, Matsumoto e Obi (1982) a irradiação não é um pré-requisito para a biossíntese de cardenolídeos, mas sua presença aumenta os teores desses metabólitos consideravelmente. Estes autores observaram que os teores de cardenolídeos de cultura de brotos adventícios de *D. purpurea* cultivados no escuro apresentaram cerca de 30% dos teores presentes em culturas sob lâmpadas fluorescentes.

A inibição da biossíntese de cardenolídeos em ambientes pobres de luz foi claramente evidenciada no presente estudo. Nota-se uma redução de, aproximadamente, 50% no teor e de

80% da produtividade de cardenolídeos totais nas plântulas cultivadas na menor densidade de fluxo de fótons ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A maior produção de cardenolídeos totais nas plântulas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* pode estar relacionado a um fator de estresse, já que plantas expostas a elevadas intensidades luminosas, podem aumentar o acúmulo de pigmentos fotossintetizantes como forma de proteção da planta, aumentando assim suas taxas fotossintéticas (BISWAL et al., 2012; KANG et al., 2012).

3.3 Qualidade da luz

A qualidade espectral da luz influenciou significativamente os parâmetros biométricos e a biossíntese e acúmulo de cardenolídeos totais *in vitro* de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* (Tabela 3).

Os resultados de crescimento foram específicos para cada variável de resposta analisada. No entanto, a luz fluorescente branca apresentou respostas significativas para todos os parâmetros biométricos estudados. A faixa espectral que mais afeta a fotossíntese é conhecida como radiação fotossinteticamente ativa (400 a 700 nm). Nesta faixa estão os espectros do azul (400 a 500 nm) e do vermelho (600 a 700 nm) (YEH; CHUNG, 2009), região espectral que favorecem não só a fotossíntese, mas também as respostas fotomorfogênicas pelas plantas; e as lâmpadas fluorescentes emitem fótons em uma ampla faixa espectral que satisfaz esses dois requisitos de iluminação (GUPTA; JATOTHU, 2013; LINA et al., 2013). Assim, as lâmpadas LEDS azul, vermelha, 2V:1A, e 1V:2A induziram os maiores números de brotos, em média 4,6 brotos. Este resultado reforça a hipótese que esta espécie necessita das luzes azul e/ou vermelha ou combinações dessas para o desenvolvimento das estruturas envolvidas no processo fotossintético e, conseqüentemente, para seu crescimento. Normalmente esses tipos de luz, azul e vermelha, têm mais impacto no crescimento das plantas, pois são as principais fontes de assimilação fotossintética de CO_2 (LINA et al., 2013). Na Figura 1 pode-se observar que as lâmpadas fluorescente e LEDs azul e vermelha apresentam seletiva absorção da luz nesses comprimentos de onda.

Tabela 3- Parâmetros de crescimento (BSF-biomassa seca de folha, BSR-biomassa seca de raiz e BST-biomassa seca total), teor e produtividade de cardenólídeos totais (CT) em plântulas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidade de luz.

Qualidade da luz	NB/explante	BSPA	BSR	BST	Teor de CT±DP	Produtividade
		g explante ⁻¹			%	g CT/explante
Controle	4,83 a	0,283 a	0,018 a	0,301 a	0,184 ± 0,010 c	0,052 b
Branca	2,86 b	0,252 b	0,011 c	0,263 c	0,290 ± 0,017 b	0,073 a
verde	3,35 b	0,210 c	0,008 c	0,281 d	0,198 ± 0,014 c	0,042 c
Azul	4,75 a	0,292 a	0,011 c	0,303 a	0,294 ± 0,012 b	0,070 a
Vermelha	4,94 a	0,237 c	0,021 a	0,258 c	0,173 ± 0,008 c	0,051 b
2V:1A	4,13 a	0,254 b	0,019 a	0,273 b	0,297 ± 0,012 b	0,075 a
1V:2A	4,25 a	0,257 b	0,016 b	0,273 b	0,313 ± 0,009 a	0,081 a
1V:1A	3,75 b	0,229 c	0,015 b	0,244 c	0,327 ± 0,020 a	0,075 a

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. NB; número de brotos; BSPA: biomassa seca da parte aérea; BSR: biomassa seca de raízes; BST: biomassa seca total; CT: cardenólídeos totais; DP: Desvio padrão ($n = 3$).

Figura 3- Brotos de *D.purpurea* subsp. *heywoodii* desenvolvidos em diferentes qualidade de luz sob o cultivo *in vitro*.



Os maiores acúmulos de biomassas secas da parte aérea e total foram obtidos nos cultivos sob lâmpadas fluorescente e monocromática azul. Já o maior acúmulo de biomassa seca de raízes foi observado nos cultivos sob a luz monocromática vermelha e 2V:1A. Nota-se que o componente da luz monocromática azul apresenta um papel importante para a translocação de fotoassimilados para a parte aérea, enquanto que a luz monocromática vermelha transloca-os para as raízes. Ainda não estão bem caracterizados os fatores que alteram a alocação de biomassa entre os órgãos de uma planta em resposta às alterações do espectro de luz, alguns estudos, no entanto, associam a percepção do sinal ambiental pelo fitocromo e receptores de luz azul (criptocromos e fototropinas) à resposta de crescimento de caules (PARKS; FOLTA; SPALDING, 2001). Segundo Kinoshita et al. (2003) a luz azul estimula a atividade fotossintética por ser responsável pela manutenção de um potencial elétrico nas membranas das células guardas e pela abertura estomática resultando no aumento da concentração do CO₂ dentro do mesofilo. Podendo-se sugerir que a diminuição da abertura dos estômatos sob LEDs vermelha tenha contribuído para uma possível diminuição na fotossíntese e conseqüentemente resultou em uma menor produção de fitoassimilados, e portanto menor biomassa pela parte aérea. George e Davies (2008) relatam os efeitos benéficos da luz vermelha no enraizamento em muitas espécies. Porém, para a espécie do presente estudo o mais importante é produção de folhas, já que princípio ativo

se concentra nesse orgão, dessa forma o uso de luz no azul e fluorescente branca seria mais vantajoso.

No entanto, plântulas que foram cultivadas com LED 1V:1A, apresentaram resposta inferior e estatisticamente equivalente àquelas cultivadas sob LEDs verde e branca. O baixo potencial da luz verde para todas as variáveis analisadas pode ser justificada por ser uma luz de pequena importância no processo de fotossíntese, principalmente pelo seu baixo coeficiente de absorção (ROCHA et al., 2010). A luz LED branca utilizada no experimento, embora absorva nos comprimentos de ondas azul e vermelha, como a fluorescente branca fria, não favoreceu o crescimento da espécie. Isto pode estar relacionado as diferenças espectrais dessas lâmpadas (figura 1). Nota-se a ausência de seletividade espectral da luz LED branca, devido a considerável absorção na faixa espectral de cerca de 530 nm a 680 nm. A lâmpada fluorescente apresenta absorção seletiva, tanto na faixa do vermelho (600-700 nm) quanto do azul (400-430 nm).

O acúmulo de cardenolídeos totais, no que tange ao teor percentual apresentou comportamento distinto em relação as respostas de crescimento. Os maiores acúmulos ocorreram nos tratamentos com 1V:2A e 1V:1A, indicando que a combinação e a proporção das luzes vermelha e azul são limitantes para a biossíntese e acúmulo de cardenolídeos totais em plântulas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii*.

Quanto a produtividade de cardenolídeos totais/plântula, apenas as plântulas desenvolvidas sob a luz fluorescente e as luzes monocromáticas verde e vermelha apresentaram menores rendimentos. Como a produtividade é dependente do acúmulo de biomassa e do teor de cardenolídeos e, as respostas observadas para estes parâmetros indicaram que a LED azul, a LED branca e todas as combinações LED azul e vermelha estudadas apresentaram resultados positivos para essa variável. Os resultados indicaram que o componente azul é importante para elevar a produtividade *in vitro* dos cardenolídeos totais em plantas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii*.

A combinada absorção dos receptores luminosos no vermelho/vermelho distante (fitocromos) e os receptores de luz azul (criptocromos e fototropinas) permitem um controle coordenado para o desenvolvimento e metabolismo das plantas (LIN, 2002). Conforme, Topchiy et al. (2005) as diferenças na qualidade da radiação espectral influenciam a composição pigmento-proteínas, que é uma característica importante para o estado funcional dos aparelhos fotossintéticos. Pelos resultados observados o componente da região espectral no azul é importante para a síntese e acúmulo de cardenolídeos, pois há necessidade de no mínimo uma

proporção equivalente àquela do componente vermelho. Isto pode estar relacionado a uma maior eficiência fotossintética da luz azul para a produção desses metabólitos secundários. Estes resultados corroboram aos de Ohlsson, Bjork e Gatenbeck (1983) que verificaram que a luz azul também levou ao aumento nos teores de cardenolídeos e de clorofila em cultura *in vitro* de *D. lanata* cepa S1. Estes autores também observaram que há alteração no perfil dos cardenolídeos conforme o regime luminoso. O aumento no teor de clorofila aumentou os teores de digitoxina. No entanto, nenhuma correlação entre o teor de clorofila foi observado com relação ao acúmulo de digoxina. Não houve diferença significativa no teor de digoxina entre as células cultivadas nas diferentes distribuições espectrais ou no escuro. Scheirner et al. (1987), estudando a influência da luz no acúmulo de cardenolídeos em embriões somáticos de *Digitalis lanata*, sugeriram que o fotoreceptor da luz azul ou protoclorofila participam da regulação da biossíntese e acúmulo de cardenolídeos nesta espécie.

3.3 Choque de luz

O choque de luz foi realizado com a intenção de induzir um estresse na planta e verificar esse efeito no crescimento e, principalmente, na produção de cardenolideos pela espécie. Muitas estratégias podem ser utilizadas para induzir ou aumentar a produção de metabólitos secundários, e uma das maneiras mais efetivas seria a aplicação de um estresse químico ou físico, como elicitores bióticos ou fatores abióticos como temperatura, luz, metais pesados, pH, etc. (FUMAGALI et al., 2008).

Avaliando o experimento de choque de luz pôde-se observar o impacto positivo da luz LED branca com $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para todas as variáveis de respostas analisadas (Tabela 4). O incremento na biossíntese de cardenolídeos foi em torno de 0,038% quando comparados aos brotos que permaneceram no mesmo ambiente de controle durante os 45 dias (fluorescente branca-fria - $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), como mostra a figura 4.

Tabela 4- Parâmetros de crescimento e acúmulo de cardenolídeos totais em plântulas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* cultivadas *in vitro* sob choque de luz.

Condições de luz	NB	BSPA	BSR	BST	Teor de CT±DP	Produtividade
	explante ⁻¹	g explante ⁻¹			%	g CT/explante
Controle	4,34 a	0,252 a	0,012 b	0,264 a	0,249 ± 0,003 c	0,063 b
Azul	3,47 b	0,200 b	0,008 c	0,208 b	0,210 ± 0,004 d	0,042 d
Vermelha	3,20 b	0,188 b	0,008 c	0,197 b	0,181 ± 0,007 e	0,034 e
20 μmol m ⁻² s ⁻¹	3,03 b	0,196 b	0,006 d	0,202 b	0,269 ± 0,016 b	0,052 c
139 μmol m ⁻² s ⁻¹	4,51 a	0,241 a	0,015 a	0,256 a	0,287 ± 0,007 a	0,069 a

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. NB; número de brotos; BSPA: biomassa seca da parte aérea; BSR: biomassa seca de raízes; BST: biomassa seca total; CT: cardenolídeos totais; DP: Desvio padrão ($n = 3$).

Figura 4- Brotos de *D.purpurea* subsp. *heywoodii* desenvolvidos em diferentes estresse de luz sob o cultivo *in vitro*.



Como já discutido no experimento de intensidade de luz (item 3.1), elevadas densidades de fluxo de fótons demonstraram, mais uma vez ser favoráveis para o acúmulo de cardenolídeos *in vitro* em *D. purpurea* subsp. *heywoodii*. A importância da luz para a produção e acúmulo de cardenolídeos em outras espécies de *Digitalis* já foi demonstrada por diversos autores (EISENBEIß; KREIS; REINHARD, 1999; HAGIMORI; MATSUMOTO; OBI, 1982; KUBERSKI et al., 1984; OHLSSON; BJORK; GATENBECK, 1983). No entanto, Eisenbeiß, Kreis e Reinhard (1999) foram os únicos a avaliarem um regime de choque de luz em cultura de brotos de *D. lanata*. Esta cultura foi mantida por 6 semanas no escuro e, em seguida por 4 semanas sob luz LED branca. Os resultados de Eisenbeiß, Kreis e Reinhard (1999) corroboram com o presente estudo, pois também demonstraram aumento no tamanho da folha e nos níveis de cardenolídeos em *D. lanata*.

Impactos das mudanças no ambiente de luz podem trazer também conseqüências danosas para as plantas, como a redução do crescimento das mesmas (GONÇALVES et al., 2010). Como observado no presente estudo, plantas transferidas para as condições de luzes azul, vermelha e $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentaram redução no crescimento quando comparadas aos brotos que não sofreram o choque de luz.

O estresse é em geral um fator externo que exerce uma influência deletéria sobre a planta, e sua capacidade de suportar ambientes desfavoráveis é conhecida como resistência ao estresse, que é melhorada com a aclimação da planta a esse ambiente (TAIZ; ZEIGER, 2009). O interesse pela fisiologia do estresse e seus efeitos no conteúdo de metabólitos secundários em plantas surgiu na tentativa de explicar as possíveis adaptações que poderiam ocorrer no metabolismo desses compostos, principalmente na maximização da sua produção, quando expostos em condições de estresse (DIXON; PAIVA, 1995; VERPOORTE et al., 1999).

4 CONCLUSÃO

Dentre as diferentes condições de luz utilizado no cultivo *in vitro* de *D. purpurea* subsp. *heywoodii*, a intensidade de $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionou melhor crescimento e produção de cardenólídeos pela espécie. LED azul proporcionam brotos com produção de biomassa e produtividade de cardenólídeos totais elevadas. O choque de luz com $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ é eficiente para produção de brotos, biomassas e cardenólídeos na espécie.

REFERÊNCIAS

- AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Spectral quality and UV-B stress stimulate glycyrrhizin concentration of *Glycyrrhiza uralensis* in hydroponic and pot system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1074-81, 2005.
- ALONSO, N. P. et al. Cardiotoxic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v. 99, p. 151-156, 2009.
- BERTOL, J. W. et al. Anti-herpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Res**, v. 92, p. 73-80, 2011.
- BISWAL, A. K. et al. Light intensity-dependent modulation of chlorophyll b Biosynthesis and photosynthesis by over expression of chlorophyll and oxygenase in tobacco. **Plant Physiology**, v. 159, n. 1, p. 433-449, May 2012.
- CLAUSSEN, J. W. Acclimation abilities of three tropical rainforest seedlings to an increase in light intensity. **Forest Ecology and Management**, v. 80, p. 245-255, 1996.
- CORDUK, N.; AKI, C. Direct shoot organogenesis of *Digitalis trojana* Ivan., an endemic medicinal herb of Turkey. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 1587-1591, 2010.
- DAS, V. S. R. **Photosynthesis, regulation under varying light regimes**. New Hampshire: Science, 2004.
- DIXON, R. A.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.
- EISENBEIß, M.; KREIS, W.; REINHARD, E. Cardenolide biosynthesis in light- and dark-grown *Digitalis lanata* shoot cultures. **Plant Physiol. Biochem**, v. 37, n. 1, p. 13-23, 1999.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) “Batum” 1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 488-490, 2005.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistemas de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos**. Lavras: Ed. UFLA, 2011.
- FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.
- GEORGE, E. F.; DAVIES, W. Effects of the physical environment. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 423-464.

GHANEM, S. A. et al. *In vitro* propagation and cardiac glycosides content of *Digitalis lanata*. **International Journal of Academic Research**, v. 2, n. 6, p. 348-356, 2010.

GONÇALVES, J. F. C. et al. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila *a* de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, n. 1, p. 89-98, 2010.

GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnol Rep**, v. 7, p. 211-220, 2013.

GUREL, E. et al. Regeneration and cardiotoxic glycoside production in *Digitalis davisiiana Heywood* (Alanya Foxglove). **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 104, p. 217-225, 2011.

HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T.; OBI, Y. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture II: effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by Undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. **Plant Physiology**, v. 69, p. 653-656, 1982.

KANG, Z. et al. Photosynthetic and physiological analysis of the rice highchlorophyll mutant Gc. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 60, p. 81-87, Nov. 2012.

KINOSHITA, T. et al. Blue-light- and phosphorylation-dependent binding of a 14-3-3 protein to phototropins in stomatal guard cells of broad bean. **Plant Physiology**, v. 133, n. 4, p. 1453-1463, 2003.

KREIS, W.; HAUG, B.; YÜCESAN, B. Somaclonal variation of cardenolide content in Heywood's foxglove, a source for the antiviral cardenolide glucoevatromonoside, regenerated from permanent shoot culture and callus. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 41, p. 35-41, 2015.

KUBERSKI, C. et al. Embryogenesis and cardenolide formation in tissue cultures of *Digitalis lanata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 7, p. 1407-1412, 1984.

LIN, C. Blue light receptors and signal transduction. **The Plant Cell**, v. 14, p. 207-225, 2002.

LINA, K. H. et al. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 86-91, 2013.

LÓPEZ-LÁZARO, M. et al. Anti-tumour activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. heywoodii. **Planta Medica**, v. 69, n. 8, p. 701-704, Aug. 2003.

LUCKNER, M.; WICHTL, M. *Digitalis*. In: LUCKNER, M.; WICHTL, M. (Ed.). **Digitalis: geschichte, biologie, biochemie, chemie, physiologie, molekularbiologie, pharmakologie, medizinische anwendung**. Stuttgart: WVGmbH, 2000. 352 p.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAVARRO, E. et al. Cardiovascular activity of a methanolic extract of *Digitalis purpurea* spp. *heywoodii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 437-42, 2000.
- OHLSSON, A. B.; BJORK, L.; GATENBECK, S. Effect of light on cardenolide production by *Digitalis lanata* tissue cultures. **Phytochemistry**, v. 22, n. 11, p. 2447-2450, 1983.
- ORT, D. R.; BAKER, N. R. Consideration of photosynthetic efficiency at low light as major determinant of crop photosynthetic performance. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 26, p. 555-565, 1988.
- PARKS, B. M.; FOLTA, K. M.; SPALDING, E. P. Photocontrol of stem growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 5, p. 436-440, 2001.
- PATIL, J. G. et al. *In vitro* propagation and production of cardiotoxic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 2379-2393, 2013.
- RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.
- RESENDE, S. V. et al. Influência da luz e substrato na germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de *Calliandra benth.* (Mimosoideae - Leguminosae) endêmicas da chapada diamantina, Bahia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 107-117, 2011.
- ROCHA, P. S. G. da et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1922-1928, 2010.
- SALES, E. et al. Plant hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82 . 139 induce efficient plant regeneration in the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. **Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 9-16, 2002.
- SCHEIRNER, H. et al. Influence of Light on Cardenolide Accumulation in Somatic Embryos of *Digitalis lanata*. **Journal Plant Physiology**, v. 130, p. 211-219, 1987.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.
- TOPCHIIY, N. M. et al. The effect of additional red irradiation on the photosynthetic apparatus of *Pisum sativum*. **Photosynthetica**, v. 43, p. 451-456, 2005.
- VERMA, S. K. et al. *In vitro* culture of *Digitalis* L. (Foxglove) and the production of cardenolides: an up-to-date review. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 20-51, 2016.

VERPOORTE, R. et al. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 467-479, 1999.

WEILER, W.; ZENK, M. H. Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1537-1545, 1976.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs: energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 2175-2180, 2009.

ANEXO A

MATERIAL SUPLEMENTAR

Relatório final referente ao doutorado sanduiche realizado na Faculdade de Ciências da Faculdade de Lisboa sob orientação da Profa. Dra. Ana Cristina Figueiredo.

1 Introdução

O gênero *Digitalis* é representado por plantas da família Plantaginaceae popularmente conhecidas como dedaleira, que produz os glicósidos cardíacos, responsáveis pelas propriedades cardiotônicas, citotóxica e antiviral das espécies (BERTOL et al., 2011; OH et al., 2005; SHARMA; PURKAIT, 2012). A planta inteira é considerada tóxica, incluindo as raízes e sementes (PATIL et al., 2013), e em condições naturais, tem sua produção limitada por fatores ambientais como clima e solo, além de dificuldades de germinação das sementes (ALONSO et al., 2009).

O cultivo *in vitro* de plantas é uma técnica eficaz na produção de metabólitos secundários, proporcionando uma maior homogeneidade, rendimento e composição química do óleo essencial, além de promover plantas geneticamente idênticas em um curto período de tempo e livre de infecção e variações sazonais (REIS et al., 2009; SHEKHAWAT; SHEKHAWAT, 2010; ZUZARTE et al., 2010). Entre as técnicas de cultura *in vitro*, o cultivo de raízes transgênicas vem ganhando força nos últimos anos, pelo rápido crescimento da cultura, sem o uso de reguladores de crescimento (SANTOS et al., 2005). Embora melhor estudado nas folhas, os cardenolídeos podem ocorrer em todos os tecidos da planta (AGRAWAL et al., 2012). Rasmann e Agrawal (2011) encontraram uma relação positiva de cardenolídeos entre a folha e a raiz em 18 espécies de *Asclepia*. Assim, objetivou-se com este trabalho o estabelecimento de raízes transgênicas de duas espécies de *Digitalis*: *D.purpurea* subsp. *heywoodii* e *Digitalis thapsi*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento de culturas de raízes transgênicas

2.1.1 MATERIAL VEGETAL

O experimento foi conduzido no Laboratório do Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL).

Para o estabelecimento de culturas de raízes transgênicas, as plântulas foram cultivadas assepticamente a partir de sementes de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* adquiridas comercialmente (Jelitto Seeds[®], Alemanha) e *Digitalis thapsi* L. obtidas de plantas coletadas conforme detalhado no relatório FFCUL de 1º ano (FUNDAÇÃO DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA - FFCUL, 2013).

As sementes foram embebidas durante a noite em água antes da lavagem numa solução de detergente a 10% durante 10 min, seguida por desinfecção de superfície com EtOH a 70% durante 30 s e NaOCl a 6% durante 5 min. Depois de lavadas quatro vezes com água estéril, as sementes foram germinadas em meio Schulz sólido (SCHULZ, 1981) (Tabela 1), sem reguladores de crescimento e mantidas a 24°C em um fotoperíodo de 16 h de luz / 8 h de escuro ($37 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Tabela 1- meio de cultura Schulz (1981).

Nutrientes	(mg/L)
KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	250
KCL	250
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250
Ca(NO ₃) ₂	1000
(HO ₂ CCH ₂) ₂ NCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CO ₂ H) ₂ (EDTA)	20
Agar	8000

O meio foi autoclavado à 1 atm a 120°C por 15 min.

2.2 INDUÇÃO DE CULTURAS DE RAÍZES TRANSGÊNICAS

As plântulas assépticas com 20 dias de idade foram utilizadas para o estabelecimento de raízes transgênicas, por inoculação com *Rhizobium rhizogenes* de acordo com novas revisões taxonômicas, *Rhizobium rhizogenes* é o sinônimo mais recente de *Agrobacterium rhizogenes*, detalhado em Faria et al. (2014)] A4 Estirpe pRiA4 :: 70GUS. As plântulas foram

cuidadosamente lesionadas com um bisturi previamente mergulhado numa suspensão de *R. rhizogenes* cultivada durante a noite sobre meio YMB (Tabela 2), limpo com papel de filtro estéril e depois transferido para placas de Petri contendo meio SH sólido (SCHENK; HILDEBRANDT, 1972) como detalhado em Faria et al. (2014). Após 48 h de co-cultura com a suspensão bacteriana no escuro, as plântulas foram transferidas para meio contendo 500 mg/L de cefotaxima, para a eliminação de *R. rhizogenes*. O material vegetal foi mantido a 24°C, em escuro.

Tabela 2- Meio de cultura YMB (Hooykaas et al., 1977).

Nutrientes	(mg/L)
Manitol	10000
Etrato de levedura	400
NaCl	100
MgSO ₄ .7H ₂ O	200
K ₂ PO ₄	500
Agar (para meio sólido)	8000
pH	6,8

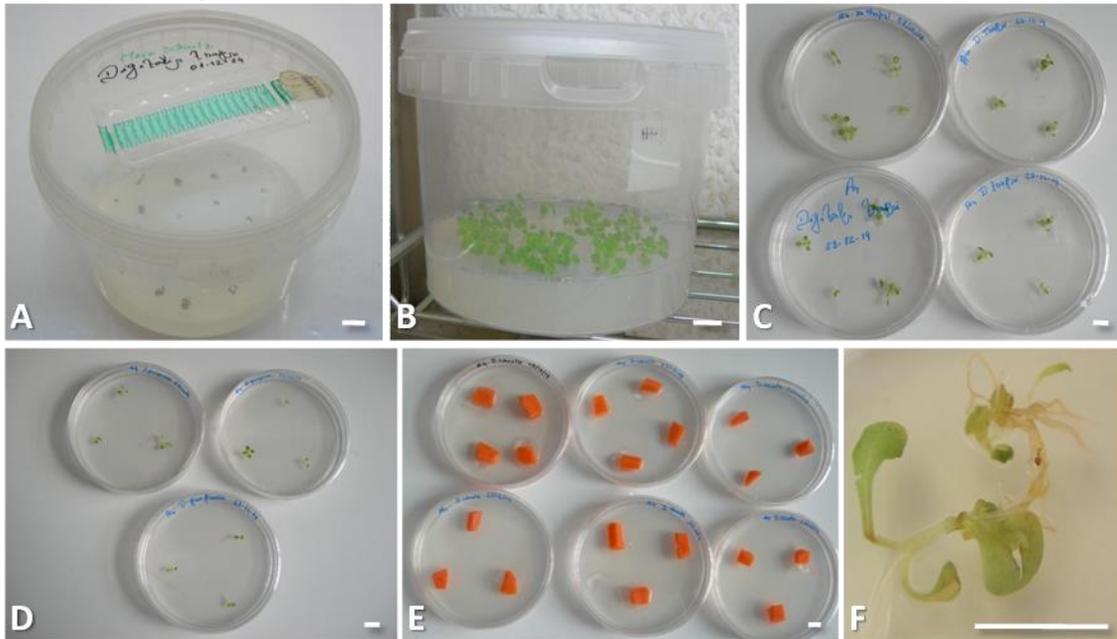
O meio foi autoclavado à 1 atm a 120°C por 15 min.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Indução da Culturas de raízes transgênicas

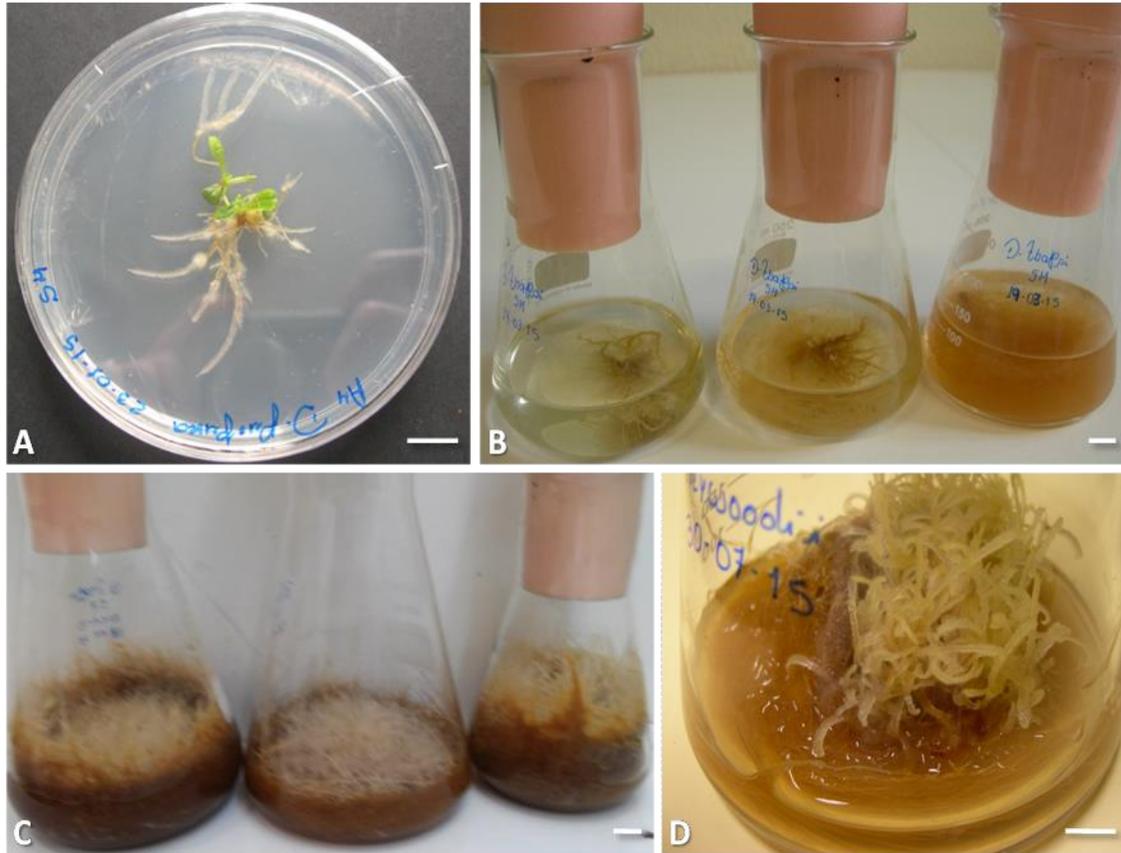
As plântulas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* foram estabelecidas com sucesso em meio Schulz (SCHULZ, 1981) (Figuras 1 A). Estas foram utilizadas no estabelecimento de raízes transgênicas após inoculação com *Rhizobium rhizogenes* (Figuras 1 C-F). Comparativamente, o material de *Daucus carota* foi utilizado para o controle do processo de inoculação (Figura 1E).

Figura 1- Indução de culturas de raízes transgênicas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii*. A,B- plântulas *in vitro* após inoculação com *Rhizobium rhizogenes*; C, D- plântulas de *D. thapsi* e *D. purpurea* subsp. *heywoodii* após inoculação com *Rhizobium rhizogenes*, respectivamente; E- *Daucus carota*, tratamento controle; F- Detalhe do crescimento de raízes. barra transgênicas em plântulas de *Digitalis*. Barras: 1cm.



As raízes transgênicas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* e *D. thapsi* foram estabelecidas com sucesso no escuro em meio SH líquido como detalhado em Faria et al. (2014), e mantidas no mesmo meio de cultura no escuro, a 24°C num agitador orbital Pilot-Shake RC-6U (Adolf Kühner AG, Suíça) 80 rpm. A partir desta fase uma rotina regular de subcultura foi utilizada para manter as culturas. Após cada 4 semanas, o subcultivo foi realizado; uma porção do agregado de raiz foi removida assepticamente e transferida para meio de cultura fresco.

Figura 2- A. Indução de raízes transgênicas de espécies de *Digitalis*. B e C, Crescimento e manutenção de raízes transgênicas de *D. thapsi*; D, raízes transgênicas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii*



3 CONCLUSÃO

Raízes transgênicas de *D. purpurea* subsp. *heywoodii* e *D. thapsi* podem ser induzidas a partir de sementes germinadas em meio sólido de Schulz, e desenvolvidas em meio de cultura SH, desde que seu subcultivo seja realizado a cada 4 semanas.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. A. et al. Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions. **New Phytologist**, v. 194, n. 1, p. 28-45, 2012.
- ALONSO, N. P. et al. Cardiotoxic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v. 99, p. 151-156, 2009.
- BERTOL, J. W. et al. Anti-herpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Res**, v. 92, p. 73-80, 2011.
- FARIA, J. M. S. I. et al. *In vitro* co-culture of *Solanum tuberosum* hairy roots with *Meloidogyne chitwoodi*: structure, growth and production of volatiles. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 118, p. 519-530, 2014.
- FUNDAÇÃO DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA. **Digitalis: the genus Digitalis: molecular taxonomy, preservation, active constituents and therapeutic applications**. Lisboa, 2013. PEOPLE MC-IRSES, FP7-PEOPLE-2011-IRSES, PIRSES-GA-2011-295251.
- HOOYKAAS, P. J. et al. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to a virulent *Agrobacterium* and *rizobium* ex planta. **Journal Gen Microbio**, v. 98, p. 477-484, 1997.
- OH, J. W. et al. Effects of phenylethanoid glycosides from *Digitalis purpurea* L. on the expression of inducible nitric oxide synthase. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 903-910, 2005.
- PATIL, J. G. et al. *In vitro* propagation and production of cardiotoxic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 2379-2393, 2013.
- RASMANN, S.; AGRAWAL, A. A. Latitudinal patterns in plant defense: evolution of cardenolides, their toxicity and induction following herbivory. **Ecology Letters**, v. 14, p. 76-83, 2011.
- REIS, E. S. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum**, v. 31, p. 331-335, 2009.
- SANTOS, P. A. G. et al. Growth and essential oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* W.D.J. Koch (lovage). **Plant Science**, v. 168, n. 4, p. 1089-1096, 2005.
- SCHENK, R.; HILDEBRANDT, A. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Journal of Botany**, v. 50, p. 199-204, 1972.
- SCHULZ, A. **Elektronmikroskopische untersucugen zur entwicklung des protonemas von**

Funaria hygrometrica. Technische Univesitat Hannover, 1981.

SHARMA, A.; PURKAIT, B. Identification of medicinally active ingredient in ultradiluted *Digitalis purpurea*: fluorescence spectroscopic and cyclic-voltammetric study. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

SHEKHAWAT, M. S.; SHEKHAWAT, N. S. Micropropagation of *Arnebia hispidissima* (Lehm). DC. and production of alkannin from callus and cell suspension culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 1445-1450, 2010.

ZUZARTE, M. R. et al. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 580-587, 2010.

APÊNDICE A

Obtenção da fórmula para cálculo do teor de cardenolídeos, expressos em β -metildigitoxina por espectrofotometria no UV-Vis, a partir da equação da reta obtida para a curva analítica.

- Considerando a equação da reta onde o intercepto difere estatisticamente de zero tem-se:

$$[\beta\text{-metildigitoxina}] = A - 0,0619 / 7,51$$

Onde: $[\beta\text{-metildigitoxina}]$ = concentração de β -metildigitoxina em mg/mL

A = absorvância a 494 nm

- Quantidade de β -metildigitoxina na solução de leitura (10 mL):

$$\begin{aligned} A - 0,0619 / 7,51 \text{ mg} & \text{-----} 1 \text{ mL} \\ x & \text{-----} 10 \text{ mL} \\ x & = \frac{10 \times (A - 0,0619) \text{ mg}}{7,51} \end{aligned}$$

- Transformação de unidade de mg para g:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mg} & \text{-----} 0,001 \text{ g} \\ \frac{10 \times (A - 0,0619) \text{ mg}}{7,51} & \text{-----} y \\ y & = 1,33 \times 10^{-3} (A - 0,0619) \text{ g} \end{aligned}$$

- Cálculo do teor de cardenolídeos totais (CT) expressa em β -metildigitoxina:

$$\begin{aligned} m \text{ (g)} & \text{-----} 100\% \\ 1,33 \times 10^{-3} (A - 0,0619) \text{ g} & \text{-----} \text{CT} \\ \text{CT} & = \frac{0,133 (A - 0,0619) \%}{m \text{ (g)}} \end{aligned}$$

Onde m = 0,1 g de folha seca