



SÂMIA TORRES SILVA SABATO

**PRODUÇÃO DE PODOFILOTOXINA EM CULTURAS DE
RAÍZES *IN VITRO* DE *Hyptis suaveolens*: ABORDAGENS
FITOTÉCNICAS E ANALÍTICAS**

**LAVRAS - MG
2021**

SÂMIA TORRES SILVA SABATO

**PRODUÇÃO DE PODOFILOTOXINA EM CULTURAS DE RAÍZES *IN VITRO* DE
Hyptis suaveolens: ABORDAGENS FITOTÉCNICAS E ANALÍTICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do Título de Doutor.

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Prof. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2021**

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

Sabato, Sâmia Torres Silva.

Produção de podofilotoxina em culturas de raízes *in vitro* de
Hyptis suaveolens: abordagens fitotécnicas e analíticas / Sâmia
Torres Silva Sabato. - 2020.

134 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientadora: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Bamburral. 2. Validação de método. 3. Lignana. I. Pinto, José
Eduardo Brasil Pereira. II. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. III.
Título.

SÂMIA TORRES SILVA SABATO

**PRODUÇÃO DE PODOFILOTOXINA EM CULTURAS DE RAÍZES *IN VITRO* DE
Hyptis suaveolens: ABORDAGENS FITOTÉCNICAS E ANALÍTICAS**

**PRODUCTION OF PODOPHYLOTOXIN IN *IN VITRO* ROOT CULTURE OF *Hyptis
suaveolens*: PHYTOTECHNICAL AND ANALYTICAL APPROACHES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do Título de Doutor.

APROVADA em 18 de dezembro de 2020.

Profa. Dra. Ana Hortência Fonseca Castro UFSJ
Dr. Osmar Alves Lameira EMBRAPA
Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci UFLA
Profa. Dra. Priscila Pereira Botrel IFSULDEMINAS

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Prof. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2021**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Agricultura (DAG), ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, aos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Fitoquímica de Plantas Medicinais da UFLA, por possibilitarem a realização do Doutorado.

Aos professores, José Eduardo Brasil e Suzan Kelly Vilela Bertolucci, pela orientação, disponibilidade, atenção, paciência, dedicação, profissionalismo e pelos conhecimentos transmitidos.

Cada um destes professores deixa sua marca na trajetória dos alunos que orientam. Prof. José Eduardo mostra paixão pelas plantas medicinais e o universo que as envolve, fica sempre muito animado com os resultados das pesquisas, tenta sempre fazer o possível com os recursos disponíveis, aliando praticidade e resolução de problemas. Além disso, transmite mensagens positivas aos alunos perante as adversidades que encontram. Profa. Suzan, também apaixonada pelas plantas medicinais, sempre procura dar o melhor de si em tudo que faz e tenta transmitir essa característica aos seus alunos. Os dois foram sempre muito bons comigo, só tenho a agradecer.

Aos funcionários Evaldo, Dico, Paulinho, Giulia e Anette. Evaldo mostra exemplo de organização e planejamento; Dico, Paulinho e Giulia estão sempre dispostos a ajudar e com bom humor; Anette é sempre prestativa e ensina com paciência. Essa equipe e a UFLA, de modo geral, transformam o estudante em termos de conhecimento técnico e valores morais. Estes são utilizados no dia-a-dia e em qualquer caminho escolhido.

Agradeço também aos amigos Luiz Eduardo, Thainá Oliveira, Giulia, Samuel, Marília, Isabella, Maria Mariana, Alexsandro, Alexandre, Nathieli, Raíssa, Érica, Vytória, Fernanda Ribeiro, Carol, Tainá Rocha, Marlon, Ludmilla, Ana Paula, Hebe, Livia, Krisnanda, Aliyu Mohammed, Smail, Giselly, Adriane, Nelma Ferreira, Nelma, Juliana, Wanderley, Wesley, Karina, Ivan, Fernanda, Mariane e Camila, alguns pela ajuda durante as pesquisas, e outros pelo tempo vivido.

Agradeço por fim, à minha mãe, irmãos e ao meu marido, que me auxiliam sempre, ao meu filho, que chegou durante o meu doutorado e trouxe alegria e a minha nova bebezinha que, já já, estará conosco.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO GERAL

Podofilotoxina (PTOX), lignana com ação anticâncer, dentre outras propriedades, pode estar presente na raiz de *H.suaveolens*. Objetivou-se validar um método analítico para a sua quantificação nas raízes da espécie e buscar a otimização da sua produção *in vitro*. Sob este tipo de cultivo, modificaram-se concentrações de reguladores de crescimento (AIB, ANA, 2,4-D), composição do meio básico de cultura (concentração de vitaminas e mio-inositol), qualidade de luz e ventilação natural. Na validação analítica, foram obtidos os seguintes resultados: seletividade (pureza: 99%), adequabilidade do sistema ($R_s = 2,92$; $N=7064$; $K=1,23$; $T=1,31$; $DPR = 0,61\%$), precisão intradia ($dpr = 2,43 \%$), precisão interdia ($dpr = 2,96\%$), linearidade ($y=14.258,498x+ 3019,954$; $R^2=0,997$), exatidão (porcentagem de recuperação em 3 níveis: 90,47%,98,03% e 101,85%), robustez (o método não é robusto em relação ao volume de clorofórmio recuperado na extração e é robusto em relação a pequenas modificações no método de análise cromatográfica) e limites de quantificação (5,25 ng) e detecção (0,5 ng). Em relação ao cultivo de raízes *in vitro* em meio MS líquido, a combinação de 1 mg L^{-1} de AIB + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA apresentou a maior matéria seca de raiz (248,76 mg) e PTOX, foi encontrado $179,97 \mu\text{g g}^{-1}$ de raiz e $0,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ de meio de cultura. No segundo experimento, o cultivo de raízes em meio MS líquido com a metade da quantidade padrão de vitaminas e mio-inositol do MS apresentou boa matéria seca de raiz (198,88 mg) e PTOX ($6,01 \mu\text{g g}^{-1}$ de raiz). Nesse ensaio, não foi encontrada PTOX no meio de cultura. No terceiro experimento, foi verificado que apenas na ausência de luz e sob luz LED vermelha ocorreu formação de raízes adventícias nas folhas de *H. suaveolens*. As matérias secas de raízes obtidas nesses tratamentos foram estatisticamente iguais, ou seja, 21,84 e 29,81mg, respectivamente. Sob ausência de luz, ocorreu maior produção de PTOX ($10,72 \mu\text{g g}^{-1}$ de raiz). No quarto experimento, de qualidade de luz e ventilação natural, o tratamento ausência de luz sem membranas possibilitou maior matéria seca de raiz (84,02 mg) e PTOX ($46,68 \mu\text{g g}^{-1}$). No quinto experimento, referente à indução de raízes em folhas em meio MS semissólido, $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA possibilitou a formação de maior matéria seca de raízes (45,53 mg). O tratamento 1 mg L^{-1} de AIB possibilitou a maior produção de PTOX ($9,96 \mu\text{g g}^{-1}$ raiz). Em relação à indução de raízes em segmentos nodais, o tratamento $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB possibilitou maior matéria seca de raízes adventícias (37,62 mg). A PTOX foi maior sob os tratamentos 1 e 2 mg L^{-1} de ANA ($9,97$ e $9,95 \mu\text{g g}^{-1}$ raiz). Concluiu-se que, dentre os sistemas analisados, para a obtenção de PTOX, o cultivo de raízes de *H.suaveolens* em meio MS líquido com 1 mg L^{-1} de AIB + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA na ausência de luz foi o mais eficiente.

Palavras-chave: Bamburral. Validação de método. Lignana. Cultura de raízes. Raízes adventícias.

GENERAL ABSTRACT

Podophyllotoxin (PTOX), a lignan with anticancer action, among other properties, may be present in the root of *H. suaveolens*. This study aimed to validate an analytical method to quantify PTOX on the roots of the species and optimize its *in vitro* production. The concentrations of growth regulators (AIB, ANA, 2,4-D), the composition of the basic culture medium (concentration of vitamins and myo-inositol), the quality of light, and natural ventilation were modified in this type of cultivation. The analytical validation presented the following results: selectivity (purity: 99%), suitability of the system ($R_s = 2.92$; $N = 7064$; $K = 1.23$; $T = 1.31$; $DPR = 0.61\%$), intraday precision ($dpr = 2.43\%$), intermediary precision ($dpr = 2.96\%$), linearity ($y = 14.258,498x + 3019.954$; $R^2 = 0.997$), accuracy (3-level recovery percentage: 90.47%, 98.03%, and 101.85%), robustness (the method is not robust regarding the volume of chloroform recovered in the extraction and is robust regarding small changes in the chromatographic analysis method), and quantification (5.25 ng) and detection (0.5 ng) limits. Regarding *in vitro* root cultivation in liquid MS medium, the combination of 1 mg L^{-1} of IBA + 0.5 mg L^{-1} of ANA presented the highest value for root dry matter (248.76 mg) and PTOX, $179.97 \mu\text{g g}^{-1}$ of root and $0.73 \mu\text{g ml}^{-1}$ of culture medium. In the second experiment, the cultivation of roots in liquid MS medium, with half the standard amount of vitamins and myo-inositol from MS, showed good root dry matter (198.88 mg) and PTOX ($6.01 \mu\text{g g}^{-1}$ of root). PTOX was not found in the culture medium in this essay. In the third experiment, adventitious roots formed on the leaves of *H. suaveolens* only in the absence of light and under red LED light. The root dry matter obtained in these treatments was statistically equal, 21.84 and 29.81mg, respectively. In the absence of light, there was a greater production of PTOX ($10.72 \mu\text{g g}^{-1}$ of root). In the fourth experiment, light quality and natural ventilation, the treatment with no light and without membranes allowed greater root dry matter (84.02 mg) and PTOX ($46,68 \mu\text{g g}^{-1}$). In the fifth experiment, regarding the induction of leaf roots in a semi-solid MS medium, 2.0 mg L^{-1} of ANA enabled the formation of greater root dry matter (45.53 mg). The treatment 1 mg L^{-1} of IBA enabled the highest production of PTOX ($9.96 \mu\text{g g}^{-1}$ root). Regarding the induction of roots in nodal segments, the treatment with 0.5 mg L^{-1} of IBA enabled greater dry matter of adventitious roots (37.62 mg). PTOX was higher under treatments 1 and 2 mg L^{-1} of ANA (9.97 and $9.95 \mu\text{g g}^{-1}$ root). The cultivation of *H. suaveolens* roots in liquid MS medium with 1 mg L^{-1} of IBA + 0.5 mg L^{-1} of ANA in the absence of light was the most efficient among the analyzed systems to obtain PTOX.

Keywords: Bamburral. Method validation. Lignan. Root culture. Adventitious roots.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - *Hyptis suaveolens* cultivada em vaso na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da UFLA, aos 60 dias de cultivo. A) Imagem da parte aérea; B) Imagem das flores; C) Imagem da raiz.22
- Figura 2 - Estrutura química da podofilotoxina.31
- Figura 3 - Biossíntese de podofilotoxina.....32
- Figura 4 - Etoposide, teniposide e etopophos.....33

SEGUNDA PARTE -ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 - Metodologia de preparo da amostra utilizada na etapa de validação do método analítico para quantificação de PTOX em raízes de *H. suaveolens*. Na robustez, verificou-se ser possível o uso de 25 mg de raiz pulverizada.68
- Figura 2 - Áreas (210 nm) e tratamentos analisados na otimização extrativa. Legenda: (C= clorofórmio, E= etanol, A=acetato de etila, H=hidroalcoólico); número de ciclos (1 ou 2); tempo de sonicação (15 minutos ou 30 minutos); T= presença de tampão fosfato de potássio pH 7. As colunas que apresentam a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.78
- Figura 3 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD para PTOX de referência e extração com clorofórmio, acetato de etila e etanol tamponados, empregando 1 ciclo de sonicação por 15 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.....80
- Figura 4 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD de extratos de raízes de *H. suaveolens* obtidos com clorofórmio, acetato de etila e etanol não tamponados, empregando 1 ciclo de sonicação por 15 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.81
- Figura 5 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD de extratos de raízes de *H. suaveolens* obtidos com clorofórmio, acetato de etila e etanol tamponados, empregando 1 ciclo de sonicação por 30 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.82
- Figura 6 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD de extratos de raízes de *H. suaveolens* obtidos com clorofórmio, acetato de etila e etanol não

tamponados, empregando 1 ciclo de sonicação por 30 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.	83
Figura 7 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD de extratos de raízes de <i>H. suaveolens</i> obtidos com clorofórmio, acetato de etila e etanol tamponados, empregando 2 ciclos de sonicação por 15 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.	84
Figura 8 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD de extratos de raízes de <i>H. suaveolens</i> obtidos com clorofórmio, acetato de etila e etanol não tamponados, empregando 2 ciclos de sonicação por 15 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.	85
Figura 9 - Perfil cromatográfico por CLAE-DAD representativo de extratos de raízes de <i>H. suaveolens</i> obtidos para a condição cromatográfica estabelecida. Condições de preparo de amostra e cromatográficas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.	87
Figura 10 - Sobreposição espectral do pico em TR=2,73 min da amostra de <i>H. suaveolens</i> (<i>unknown</i>) com o pico de PTOX de referência (<i>known</i>) a 210 nm.	88
Figura 11 - Curvas analíticas e média das curvas obtidas por CLAE-FR, em três dias consecutivos para PTOX.	92
Figura 12 - Cromatogramas representativos obtidos por CLAE-DAD na etapa de exatidão para amostra controle (sem adição de padrão) e amostras com adição de padrão (níveis mínimo, médio e máximo) de <i>H. suaveolens</i> obtidos para a condição cromatográfica estabelecida. Condições de preparo de amostra e cromatográficas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.	97
Figura 13 - Raízes de <i>Hyptis suaveolens</i> após o cultivo <i>in vitro</i> por 42 dias, em meio MS líquido suplementado com diferentes concentrações de AIB e ANA (mg L ⁻¹), respectivamente: T1 = 0,0 (controle); T2 = 0,5 + 0,5; T3 = 0,5 + 1,0; T4 = 1,0 + 0,5; T5 = 0,5 + 0,0; T6 = 1,0 + 0,0; T7 = 0,0 + 0,5; T8 = 0,0 + 1,0.	101
Figura 14 - Cromatogramas obtidos por CLAE - DAD (Raízes).TR PTOX = 2,8 minutos. Os meios foram suplementados com diferentes concentrações de AIB e ANA, respectivamente descritas a seguir (em mg L ⁻¹): T1 = 0,0 (controle)/ T2 = 0,5 + 0,5; T3 = 0,5 + 1,0; T4 = 1,0 + 0,5; T5=0,5 + 0,0; T6= 1,0 + 0,0; T7= 0,0 + 0,5; T8= 0,0 + 1,0.	103
Figura 15 - Meios de cultura líquidos MS após o cultivo <i>in vitro</i> de raízes de <i>H.suaveolens</i> dentro deles por 42 dias. Os meios foram suplementados com	

	diferentes concentrações de AIB e ANA, respectivamente descritas a seguir (em mg L ⁻¹): T1 = 0,0;0,0 (controle)/ T2 = 0,5; 0,5/ T3 = 0,5;1,0/T4 = 1,0;0,5/T5=0,5;0,0/T6= 1,0;0,0/T7= 0;0,5/T8= 0;1,0.	104
Figura 16 -	Cromatogramas obtidos por CLAE - DAD (Meio de cultura líquido).TR PTOX = 2,8 minutos. Os meios foram suplementados com diferentes concentrações de AIB e ANA, respectivamente descritas a seguir (em mg L ⁻¹): T1 = 0,0;0,0 (controle)/ T2 = 0,5; 0,5/ T3 = 0,5;1,0/T4 = 1,0;0,5/T5=0,5;0,0/T6= 1,0;0,0/T7= 0;0,5/T8= 0;1,0.	104
Figura 17 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (quantificação de PTOX nas raízes). TR PTOX = 2,8 min. T1) MS sem vitaminas e sem mio-inositol, T2) MS metade vitaminas e metade mio-inositol, T3) MS normal, T4) MS dobro de vitaminas e mio-inositol.....	107
Figura 18 -	Meios de cultura líquidos após o cultivo <i>in vitro</i> de raízes de <i>H.suaveolens</i> nos mesmos, por 44 dias (MS com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol). T1) MS sem vitaminas e sem mio-inositol, T2) MS metade vitaminas e metade mio-inositol, T3) MS normal, T4) MS dobro de vitaminas e mio-inositol. Na imagem estão apresentadas 5 repetições de cada tratamento.	107

ARTIGO 2

Figura 1 -	Indução de raízes adventícias em folhas de <i>H. suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> sob diferentes qualidades de luz. T1 = LED Vermelho, T2 = LED Azul, T3 = LED Branco, T4 = Fluorescente, T5 = Ausência de Luz.	122
Figura 2 -	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (quantificação de PTOX nas raízes). T1 = Ausência de Luz, T5 = LED vermelho.	124
Figura 3 -	Raízes de <i>H. suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> sob diferentes qualidades de luz e sistemas de membranas. T1 = Ausência de luz sem membranas, T2 = Ausência de luz com 4 membranas, T3 = Vermelho sem membranas., T4 = Vermelho com 4 membranas, T5 = 2 vermelho:1 azul sem membranas, T6 = 2 Vermelho:1 azul com 4 membranas.	126
Figura 4 -	Cromatogramas obtidos por CLAE - DAD (Quantificação de PTOX nas raízes). T1 = Ausência de Luz sem membranas, T2 = Ausência de Luz com 4 membranas, T3 = Vermelho sem membranas, T4 = Vermelho com 4 membranas, T5 = 2,5 vermelho1 azul sem membranas.	127

Figura 5 - Indução de raízes em folhas de *H.suavceolens* cultivadas *in vitro* por 48 dias em meio MS semissólido suplementado com 2,4-D, AIB e ANA. .T1 = 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D; T2 = 1 mg L⁻¹ de 2,4-D; T3= 2 mg L⁻¹ de 2,4-D; T4 = 0,5 mg L⁻¹ de AIB; T5 = 1 mg L⁻¹ de AIB; T6= 2,0 mg L⁻¹ de AIB; T7= 0,5 mg L⁻¹ de ANA; T8 = 1,0 mg L⁻¹ de ANA; T9=2 mg L⁻¹ de ANA. 129

Figura 6 - Indução de raízes em segmentos nodais de *H.suavceolens* cultivados *in vitro* por 48 dias, em meio MS semissólido suplementado com 2,4-D, AIB e ANA. .T1 = 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D; T2 = 1 mg L⁻¹ de 2,4-D; T3= 2 mg L⁻¹ de 2,4-D; T4 = 0,5 mg L⁻¹ de AIB; T5 = 1 mg L⁻¹ de AIB; T6= 2,0 mg L⁻¹ de AIB; T7= 0,5 mg L⁻¹ de ANA; T8 = 1,0 mg L⁻¹ de ANA; T9=2 mg L⁻¹ de ANA. 130

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Descrição resumida dos trabalhos citados no tópico (2.5).	39
--	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Condições de extração avaliadas para raízes de <i>H. suaveolens</i>	62
Tabela 2 - Gradiente linear de eluição empregado para registro dos perfis cromatográficos exploratórios por CLAE-FR.	64
Tabela 3 - Etapas do desenvolvimento do método cromatográfico.	66
Tabela 4 - Programa de eluição estabelecido para a quantificação de PTOX em extrato de raízes de <i>H. suaveolens</i>	69
Tabela 5 - Correspondência entre volumes e as massas injetadas para a construção das curvas analíticas de podofilotoxina (PTOX).	71
Tabela 6 - Correspondência entre os volumes e as massas das soluções de referência de PTOX adicionadas ao extrato clorofórmico de raízes de <i>H. suaveolens</i> na determinação da exatidão de PTOX.	72
Tabela 7 - Condições empregadas para a avaliação da robustez quanto a alterações no volume da fração clorofórmica durante a preparação das amostras de raízes de <i>H. suaveolens</i> (cada nível, $n=3$).	73
Tabela 8 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas da solução de referência para determinação dos limites de quantificação e detecção de podofilotoxina.	74
Tabela 9 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas da solução de referência para determinação dos limites de quantificação e detecção de podofilotoxina.	75
Tabela 10 - Área relativa média ($n=6$) do pico correspondente a PTOX durante a avaliação da estabilidade química, a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), por até 42 h das amostras preparadas a partir de raízes de <i>H. suaveolens</i>	86
Tabela 11 - Parâmetros da adequabilidade do sistema, valores médios obtidos e valores recomendados por Epshtein (2020).	89

Tabela 12 - Área relativa do pico correspondente a PTOX e desvio padrão relativo observados na determinação da repetibilidade de amostras de <i>H. suaveolens</i> na condição cromatográfica estabelecida. Condições de preparo de amostra e cromatográficas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.	89
Tabela 13 - Área relativa do pico correspondente a PTOX e desvio padrão relativo observados na determinação da precisão intermediária de amostras de <i>H. suaveolens</i> na condição cromatográfica estabelecida. Condições de preparo de amostra e cromatográficas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.....	90
Tabela 14 - Massa injetada, áreas médias ($n=3$) e desvio padrão relativo dos pontos das curvas analíticas, obtidas nos 3 dias de análise. Condições cromatográficas vide item 2.6.2.	91
Tabela 15 - Dados de regressão linear para as curvas analíticas de PTOX, em três dias consecutivos de análise.....	92
Tabela 16 - Limites de quantificação e detecção determinados com base nos parâmetros das curvas analíticas obtidas. Condições cromatográficas vide item 4.2.	93
Tabela 17 - Limites de quantificação e detecção determinados experimentalmente. Condições cromatográficas vide item 2.6.2.....	94
Tabela 18 - Valores de recuperação de PTOX (média, $n=3$).	96
Tabela 19 - Massas de PTOX obtidas durante a avaliação da robustez de amostras de <i>H. suaveolens</i> frente a variações deliberadas na condição cromatográfica estabelecida. Condições de preparo de amostra e cromatográfica estabelecida vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.	98
Tabela 20 - Massas de PTOX obtidas durante a avaliação da robustez de amostras de <i>H. suaveolens</i> frente a variações no volume de extrato clorofórmico pipetado durante o procedimento de preparo de amostra. Condições de preparo de amostra e cromatográfica estabelecidas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.	98
Tabela 21 - Valores de recuperação de PTOX nas amostras de raízes de <i>H. suaveolens</i> durante a avaliação da robustez quanto a alterações no volume do extrato clorofórmico durante a preparação das amostras (média, $n=3$).	99
Tabela 22 - Matéria fresca de raiz final (MFR em g) e seca (MSR em mg), índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas in vitro em meio MS líquido suplementado com diferentes combinações de AIB e ANA. MFRI (matéria fresca de raiz	

inicial), MSRI (matéria seca de raiz inicial), ICMF (índice de crescimento de matéria fresca); ICMS (índice de crescimento de matéria seca).....	100
Tabela 23 - Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX na Raiz, em $\mu\text{g g}^{-1}$), no meio de cultura (PTOX no Meio, em $\mu\text{g mL}^{-1}$), na raiz total produzida pelos tratamentos (PTOX Total na raiz seca, em μg), total no meio de cultura de cada tratamento (PTOX Total no Meio, em μg) e PTOX total incluindo a da raiz e a do meio de cultura (PTOX Total (Raiz + Meio), em μg).	102
Tabela 24 - Matérias frescas e secas finais de raízes (mg) de <i>H. suaveolens</i> obtidas após o cultivo das mesmas em meio líquido MS com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol por 44 dias.....	105
Tabela 25 - Quantificação de PTOX ($\mu\text{g g}^{-1}$) em raízes de <i>H.suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> em meio de cultura MS líquido com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol por 44 dias.....	106

ARTIGO 2

Tabela 1 - Programa de eluição estabelecido para a quantificação de PTOX em extrato de raízes de <i>H.suaveolens</i>	119
Tabela 2 - Número (NR), tamanho (TR) (cm) e matérias fresca (MFR)(mg) e seca de raízes (MSR) (mg) obtidas de folhas de <i>H. suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> sob diferentes qualidades de luz.	121
Tabela 3 - Quantificação de PTOX ($\mu\text{g g}^{-1}$ de raiz) nos tratamentos de qualidade de luz que possibilitaram obtenção de maior matéria seca de raízes adventícias obtidas a partir de folhas de <i>H.suaveolens</i>	123
Tabela 4 - Matéria fresca de raízes (MFR) (mg), porcentagem de enraizamento (E) (%) e matéria seca de raízes (MSR) (mg) oriundas de folhas <i>H. suaveolens</i> cultivada <i>in vitro</i> sob diferentes sistemas de membranas.	125
Tabela 5 - Quantificação de PTOX nas raízes adventícias originadas de folhas nos tratamentos de qualidade de luz e sistema de membranas.....	127
Tabela 6 - Porcentagem de calos (% Calos), número (NR), tamanho (TR) e matéria fresca (MFR) e seca (MSR) de raízes adventícias obtidas a partir de folhas de <i>H. suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> por 48 dias, em meio de cultura MS semissólido suplementado com diferentes concentrações de 2,4D, AIB e ANA.....	128

Tabela 7 - Porcentagem de calos (% Calos), número (NR), tamanho (TR) e matéria fresca (MFR) e seca (MSR) de raízes adventícias obtidas a partir de segmento internodal de <i>H. suaveolens</i> cultivados <i>in vitro</i> por 48 dias, em meio de cultura MS semissólido suplementado com diferentes concentrações de 2,4D, AIB e ANA.....	129
Tabela 8 - Podofilotoxina obtida em raízes adventícias originadas de folhas e segmentos nodais de <i>H. suaveolens</i> cultivados <i>in vitro</i> em meio MS semissólido com diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA.....	131

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	17
1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	A família Lamiaceae e o gênero <i>Hyptis</i>	19
2.2	<i>Hyptis suaveolens</i> : aspectos gerais e agronômicos	22
2.3	Composição química e aplicações potenciais de <i>Hyptis suaveolens</i>	25
2.4	Podofilotoxina (PTOX): ocorrência, biossíntese e farmacologia	29
2.5	Cultivo <i>in vitro</i> de plantas e produção de podofilotoxina (PTOX).....	34
2.6	Validação de método analítico através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	42
	REFERÊNCIAS	45
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	56
	ARTIGO 1 - VALIDAÇÃO ANALÍTICA E PRODUÇÃO DE PODOFILOTOXINA EM CULTURA DE RAÍZES <i>in vitro</i> DE <i>Hyptis suaveolens</i>	56
1	INTRODUÇÃO	59
2	MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1	Material vegetal	61
2.2	Químicos.....	61
2.3	Otimização extrativa	61
2.4	Análises de perfis cromatográficos por CLAE-FR	63
2.4.1	Preparo das amostras.....	63
2.4.2	Condições cromatográficas.....	63
2.5	Desenvolvimento do método cromatográfico.....	64
2.5.1	Sistema cromatográfico	64
2.5.2	Preparo das amostras.....	64
2.5.3	Estabilidade química de PTOX após o preparo da amostra	65
2.5.4	Preparo da solução de referência (PTOX)	65
2.5.5	Desenvolvimento da condição cromatográfica	65
2.6	Validação do método analítico	67
2.6.1	Preparo da amostra.....	67
2.6.2	Condição cromatográfica estabelecida.....	68
2.6.3	Seletividade	69
2.6.4	Teste de adequabilidade do sistema.....	69
2.7	Precisão.....	70
2.7.1	Linearidade	70
2.7.2	Estimativas de faixas de concentração de trabalho.....	70
2.7.3	Soluções estoque de referência (PTOX)	70
2.7.4	Exatidão.....	71
2.7.5	Robustez	72
2.7.6	Limite de quantificação.....	73
2.7.7	Limite de detecção	74
2.8	Estabelecimento da espécie <i>in vitro</i>	75
2.9	Cultivo <i>in vitro</i> de raízes de <i>H. suaveolens</i> em meio líquido com AIB e ANA	75
2.10	Preparo das amostras para quantificação de PTOX	76
2.11	Cultivo <i>in vitro</i> de raízes de <i>H. suaveolens</i> em meio líquido com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol	76

2.12	Análises estatísticas	77
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1	Otimização extrativa	78
3.2	Estabilidade do analito após o preparo da amostra	86
3.3	Desenvolvimento da condição cromatográfica	86
3.4	Validação do método analítico	87
3.4.1	Seletividade	87
3.4.2	Teste de adequabilidade do sistema	88
3.4.3	Precisão.....	89
3.4.4	Linearidade	90
3.4.5	Limites de quantificação e detecção.....	93
3.4.6	Exatidão.....	94
3.4.7	Robustez	97
3.5	Cultivo <i>in vitro</i> de raízes de <i>H. suaveolens</i> em meio líquido com AIB e ANA	99
3.6	Cultivo <i>in vitro</i> de raízes de <i>H. suaveolens</i> em meio líquido com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol	105
4	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	110
	ARTIGO 2 - PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PODOFILOTOXINA POR RAÍZES ADVENTÍCIAS DE <i>Hyptis suaveolens</i>.....	113
1	INTRODUÇÃO	116
2	MATERIAL E MÉTODOS	118
2.1	Indução de raízes adventícias em folhas sob diferentes qualidades de luz	118
2.2	Indução de raízes em folhas sob diferentes qualidades de luz e sistemas de ventilação natural.....	118
2.3	Indução de raízes adventícias em folhas e segmentos nodais de <i>H. suaveolens</i> sob diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA.....	118
2.4	Extração de PTOX	119
2.5	Preparo das amostras para CLAE.....	119
2.6	Condição cromatográfica estabelecida	119
2.7	Análises estatísticas	120
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
3.1	Indução de raízes adventícias em folhas de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas sob diferentes qualidades de luz.....	121
3.2	Indução de raízes em folhas de <i>H. suaveolens</i> sob diferentes qualidades de luz e ventilação natural	124
3.3	Indução de raízes adventícias em folhas e segmentos nodais de <i>Hyptis suaveolens</i> em meio MS suplementado com 2,4-D, AIB e ANA	128
4	CONCLUSÃO	132
	REFERÊNCIAS	133

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Hyptis suaveolens, Lamiaceae nativa da América Tropical, é uma das plantas invasoras mais bem sucedidas do mundo (MARTINS; POLO, 2009; NGOZI, 2014; PADALIA; SRIVASTAVA; KUSHWAHA, 2014). Podofilotoxina (PTOX) foi isolada de raízes da espécie (TANG *et al.*, 2019). Essa substância é uma lignana ariltetralina antiviral, antirreumática e inseticida. No Brasil, está em uso clínico como antiviral no tratamento de verrugas venéreas causadas pelo vírus do papiloma. Além disso, apresenta citotoxicidade. Devido a essa propriedade, tornou-se um composto atraente para a fabricação de medicamentos anticâncer. Atualmente, vários de seus derivados semi-sintéticos estão em uso para o tratamento de doenças malignas (CASTRO *et al.*, 2015).

Devido a sua síntese química ser um processo complexo, o preço da PTOX obtida por essa forma é elevado. Assim, a sua obtenção através de plantas é mais economicamente viável. As plantas fontes de PTOX são superexploradas, e podem correr o risco de extinção, como ocorre com a espécie *Podophyllum hexandrum* (ARDALANI; AVAN; GHAYOUR-MOBARHAN, 2017; KUMAR *et al.*, 2015; KUMARI; SINGH; KUMAR, 2017; LIU *et al.*, 2014). A aplicação de técnicas de cultivo *in vitro* de plantas pode ser uma alternativa para contornar esse problema. Essas técnicas possibilitam a produção de plantas livres de doenças, multiplicação rápida e transformação de genomas (ESPINOSA-LEAL; PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA, 2018).

Esse tipo de cultivo pode ser realizado através de calos, culturas de suspensão celular ou estruturas organizadas como brotos, raízes e embriões somáticos. A tecnologia de cultura de raiz é atrativa para maior produção de metabolitos. Podem ser culturas de raízes transformadas ou não, havendo possibilidade de aplicação comercial (GONÇALVES; ROMANO, 2018). Nos últimos anos, pesquisadores têm otimizado as condições de cultivo *in vitro* por meio da mudança de fatores bióticos e abióticos ou pela aplicação de seleção de linhagem celular, elicitação e alimentação precursora. Os esforços são feitos visando à possibilidade de ampliar a produção, atender à demanda da indústria farmacêutica e conservar as fontes naturais das moléculas (ISAH *et al.*, 2018).

Como exemplo de pesquisa na área de cultura de tecidos que otimizou as condições de cultivo *in vitro* para a obtenção de PTOX, pode ser citado o trabalho de Esfandiari *et al.* (2018). Os autores avaliaram o teor de lignanas em raízes de *Linum persicum* cultivadas *in*

in vitro. Tratamentos com ácido naftaleno acético (ANA) (2 mg.L^{-1}) aumentaram o teor de PTOX. Por outro lado, no trabalho de Meira *et al.* (2017), os autores cultivaram *in vitro* segmentos nodais de *Linum macrostachys* sob diferentes condições e avaliaram PTOX. Dentre os tratamentos, o tratamento $\frac{1}{2}$ MS com 15 g de sacarose possibilitou maior concentração de PTOX nas plântulas.

Para que a PTOX obtida por cultura de tecidos vegetais seja utilizada pela indústria farmacêutica, é necessário validar o método analítico utilizado. A validação de método analítico é um processo utilizado para confirmar que o procedimento empregado para a análise de uma substância de interesse apresenta confiabilidade e resultados consistentes (PATIL; AHIRRAO; PAWAR, 2017). O desenvolvimento do método resulta em métodos oficiais de testes e controle de qualidade. A aprovação de produtos pelas autoridades regulamentadoras exige que o solicitante prove o controle de todo o processo de desenvolvimento (RAVISANKAR *et al.*, 2015).

Assim, no presente trabalho, objetivou-se validar um método analítico para a quantificação de PTOX em raízes de *H. suaveolens* e buscar a otimização da produção de PTOX por raízes da espécie obtidas *in vitro*. Realizaram-se para esse fim, o uso de reguladores de crescimento (AIB, ANA, 2,4-D), mudanças na composição do meio básico de cultura (concentração de vitaminas e mio-inositol) e no ambiente de cultivo (diferentes qualidades de luz e ventilação natural).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A família Lamiaceae e o gênero *Hyptis*

A família Lamiaceae é quase cosmopolita, estando ausente apenas nos lugares mais frios das regiões de alta latitude ou altitude. Apresenta cerca de 240 gêneros e 7200 espécies. Inclui sete subfamílias, a maioria das espécies estão inseridas nas subfamílias Lamioideae e Nepetoideae. Nepetoideae, a maior delas, tem seus membros distribuídos nas tribos Mentheae, que ocorre principalmente em zonas temperadas, e Ocimeae, mais comum em áreas tropicais (HARLEY, 2012). Plantas medicinais dos seguintes gêneros estão incluídas em Lamiaceae: *Tymus*, *Salvia*, *Rosmarinus*, *Ocimum*, *Origanum*, *Marrubium*, *Mentha*, *Melissa*, *Lavandula*, *Hyptis*, dentre outros (URITU *et al.*, 2018).

As Lamiaceae são conhecidas por suas atividades antissépticas, anti-inflamatórias, antifúngicas, antioxidantes, carminativas e antimicrobianas. Os óleos essenciais extraídos das espécies dessa família são utilizados em perfumes, cosméticos e para diversas aplicações médicas (HASSANEIN *et al.*, 2020). Esses óleos consistem em monoterpenos e sesquiterpenos, bem como seus derivados (álcoois, aldeídos, ésteres e acetatos). As partes aéreas dessas plantas contêm flavonoides, triterpenoides e monoterpenos, particularmente nas folhas e flores (SAEIDNIA *et al.*, 2014).

Essa composição química confere às Lamiaceae, as propriedades citadas anteriormente, bem como potencial de uso como alimento funcional. O que poderia ajudar a atender às necessidades dos consumidores de dieta saudável. Como exemplo, *H. suaveolens* (a planta inteira) é citada como comestível, com propriedades carminativas, estomacais, estimulantes e antimicrobianas. As folhas de *Mentha arvensis* são comestíveis com atividade analgésica, antisséptica, antiespasmódica, carminativa, antimicrobiana e antioxidante. A parte aérea de *Melissa officinalis* apresenta propriedade digestiva, carminativa, antimicrobiana, antioxidante e antibacteriana (CAROVIĆ-STANKO *et al.*, 2016).

Kozłowska *et al.* (2015) analisaram a composição química volátil e não volátil de extratos etanólicos e metanólicos, ambos aquosos, da parte aérea de algumas espécies dessa família. Por meio de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) identificaram-se em tomilho (*T. vulgaris*): timol, carvacrol e eugenol; em alecrim (*Rosmarinus officinalis*): cânfora, borneol e α -terpineol; em orégano (*Origanum vulgare*): timol, indol, ácido palmítico e ácido α -linoleico. Em adição, através de cromatografia líquida

de alta eficiência (CLAE), verificaram-se a presença dos ácidos rosmarínico e cafeico nos dois tipos de extratos e em ambas as espécies estudadas.

Em relação às aplicações de alguns desses constituintes químicos, destaca-se que o carvacrol é utilizado como aditivo alimentar, apresentando propriedade antibacteriana (LIMA *et al.*, 2017). O eugenol é utilizado na indústria de alimentos como conservante, principalmente devido à sua propriedade antioxidante (BARBOZA *et al.*, 2018). O ácido rosmarínico apresenta efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (HASE *et al.*, 2019). E por fim, o ácido cafeico apresenta atividade antioxidante, aumenta a produção de colágeno, previne o envelhecimento precoce e apresenta atividade antimicrobiana (MAGNANI *et al.*, 2014).

Para exemplificar a composição química do óleo essencial das Lamiaceae, seguem espécies do gênero *Mentha* e seus respectivos constituintes majoritários: *M. canadensis* (mentol), *M. piperita* (mentol, mentona e acetato de mentila), *M. spicata* ssp., *M. viridis* e *M. gracilis* (carvona), *M. citrata* (linalol e acetato de linalil), *M. pulegium* (pulegona) e *M. aquatica* (mentofurano). *M. haplocalyx* apresenta seis quimiotipos, incluindo linalol, pulegona, mentona, carvona, mentol e óxido de piperitona (FATIH *et al.*, 2017). O mentol é utilizado para dar sabor, tratar resfriado, como anestésico local, em produtos para a pele, dentre outras aplicações (KLUMPP *et al.*, 2020).

Os flavonóides são um exemplo de compostos fenólicos com alto poder antioxidante e espécies da família Lamiaceae possuem em sua composição esses antioxidantes naturais (SILVA *et al.*, 2017). No trabalho de Sobeh *et al.* (2020), a composição química dos extratos metanólicos das folhas de *Thymus fontanesii* foi caracterizada por CLAE-EM. O flavonoide metilado salvigenina foi um dos principais metabólitos secundários encontrados no extrato da espécie.

Muitas Lamiaceae são endêmicas do semiárido nordestino, por exemplo, as do gênero *Hyptis* (OLIVEIRA *et al.*, 2011). *Hyptis* apresenta aproximadamente 400 espécies. Inclui ervas, subarbustos, arbustos e pequenas árvores, anuais ou perenes. Suas plantas apresentam caules quadrangulares, folhas opostas, simples ou compostas, pecioladas ou sésseis. Alguns exemplos de espécies do gênero e usos são: *H. suaveolens* (propriedades estomacais), *H. capitata* (resfriado, febre e asma), *H. verticillata* (anti-infecção e dor de cabeça), *H. spicigera* (controle de insetos), *H. pectinata* (antibacteriana, anti-micótica), *H. mutabilis* (anti-malária), *H. albida* (anti-séptica) e *H. marrubioides* (inseticida) (FALCÃO; MENEZES, 2003; MENEZES *et al.*, 2020).

Em relação à composição química do óleo essencial (OE) do gênero, podem ser citados os resultados do trabalho de Sharma *et al.* (2019), que analisaram o OE de *H. suaveolens*. A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) do OE extraído de folhas da espécie levou à identificação de 28 constituintes químicos, representando 99,67% dos compostos do óleo. Identificaram-se 79,33% de monoterpenos, predominantemente monoterpenos hidrocarbonetos. Os principais monoterpenos identificados no óleo foram: α -felandreno, α -pineno, alo-ocimeno, limoneno, β -tujeno, γ -terpineno e o-cimeno.

As espécies desse gênero apresentam atividade antioxidante. Tafurt-García, Jiménez-Vidal e Calvo-Salamanca (2015) analisaram a capacidade antioxidante (CA) e o teor de fenóis totais (FT) de extratos etanólicos de folhas de *H. conferta*, *H. dilatata*, *H. mutabilis* e *H. suaveolens*. *Hyptis dilatata* apresentou a maior CA. O teor de fenóis totais foi maior em *H. conferta*. Além dos extratos etanólicos, o óleo essencial de espécies de *Hyptis* também apresenta atividade antioxidante. Sua coloração é amarelo pálido e apresenta cheiro perfumado. O rendimento de óleo (v / m) de *H. suaveolens*, *H. rhomboidea* e *H. brevipes* pode ser em torno de 0,9, 0,4 e 0,5%, respectivamente (XU *et al.*, 2013).

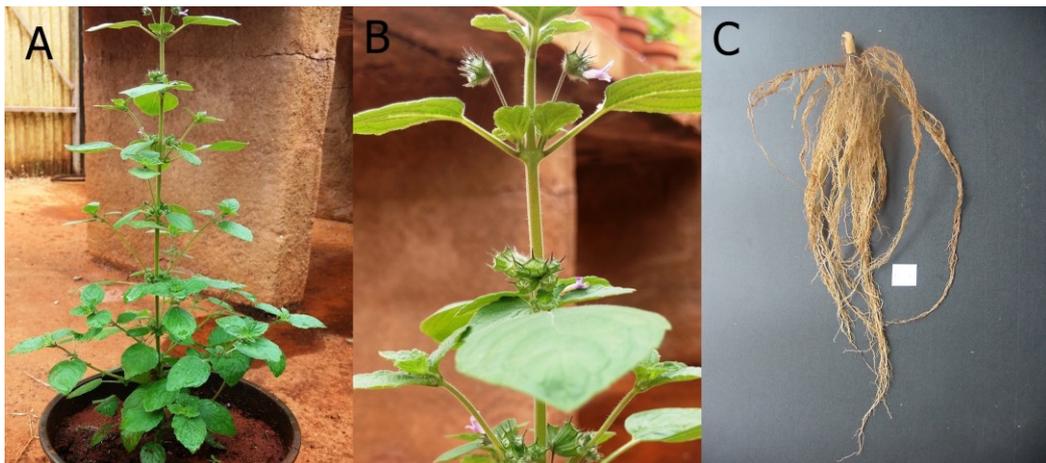
Em outro trabalho, Kusuma *et al.* (2020) realizaram triagem fitoquímica de extratos metanólicos de folhas de *H. capitata* coletadas de plantas de dois locais em Kalimantan Oriental, na Indonésia. Alcaloides, flavonoides, taninos, carboidratos e cumarinas foram encontrados em todas as amostras. *H. capitata* é utilizada para prevenir infecções de ferimentos e como antídoto para intoxicação alimentar pelo povo bentiano, uma tribo local em Kalimantan Oriental, na Indonésia. Os estudos fitoquímicos e as atividades biológicas da espécie são pouco relatados em relação aos de espécies da mesma família.

Plantas do gênero *Hyptis* também podem apresentar em suas composições constituintes anticancerígenos. Santana *et al.* (2019) demonstraram o potencial anticâncer do extrato etanólico das inflorescências de *H. pectinata* e comprovaram que as substâncias responsáveis pelo efeito antiproliferativo foram pectinolide J, hyptolide e pectinolide E, em associação. Além disso, esses compostos podem ser utilizados na produção de medicamentos na tentativa de desenvolver novos compostos com menos efeitos colaterais quando comparados à quimioterapia convencional.

2.2 *Hyptis suaveolens*: aspectos gerais e agronômicos

Dentre as espécies de *Hyptis* que ocorrem no cerrado brasileiro, pode ser citada a espécie *H. suaveolens*, conhecida como bamburral ou erva-canudo (FIGURA 1). Essa planta é um subarbusto anual, ereto, ramificado, semilenhoso, com caule e ramos quadrangulares, e podem chegar a 2 m de altura. Suas folhas são aromáticas, opostas, com lâmina oval ou subcordada, de margem serrada e pecíolo subquadrangular. Apresenta inflorescências paucifloras, flores arroxeadas-azuladas e estames presos ao lábio inferior da corola, que é característica de espécies com mecanismo explosivo de polinização. O seu fruto é do tipo esquizocárpico (BASÍLIO *et al.*, 2006; LEWU *et al.*, 2017; MARTINS; POLO, 2009; PADALIA; SRIVASTAVA; KUSHWAHA, 2014; PRIYA, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Figura 1 - *Hyptis suaveolens* cultivada em vaso na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da UFLA, aos 60 dias de cultivo. A) Imagem da parte aérea; B) Imagem das flores; C) Imagem da raiz.



Fonte: Da autora (2020).

É uma planta aromática. O aroma contido nas plantas é geralmente secretado por tricomas glandulares. Em *H. suaveolens* foram realizadas observações sobre o tipo e distribuição de tricomas utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. A partir dos resultados do estudo, pode-se concluir que, na folha de *H. suaveolens*, observaram-se diferentes tipos de tricomas, quais sejam, peltato glandular unicelular, não glandular, monocelular, capitado tipo I e capitado tipo II. Tanto os tricomas não glandulares quanto os tricomas glandulares foram observados dispersos em regiões abaxial e adaxial foliar e estavam presentes nas nervuras (CHATRI *et al.*, 2018).

Hyptis suaveolens é uma espécie nativa da América Tropical, mas com distribuição ampla, ocorrendo ao longo de estradas e fazendas, nos trópicos e subtropicais. Na América do Sul, encontra-se na Guiana Francesa, Brasil, Venezuela e Equador, na América do Norte, nos Estados Unidos; Na Ásia, em Bangladesh, China e Índia, e na África, em Benin, Quênia, Nigéria, Sudão e Camarões (MARTINS; POLO, 2009; NGOZI, 2014). De acordo com Padalia, Srivastava e Kushwaha (2014), *H.suaveolens* é uma das ervas invasoras mais bem-sucedidas do mundo.

No noroeste da Índia, o número de espécies diminuiu de 46 a 52% nas áreas massivamente invadidas pela espécie. Além disso, também ocorreram alterações no pH, condutividade, carbono orgânico e matéria orgânica do solo (SHARMA *et al.*, 2017). Contribuindo para que essa planta apresente invasão e colonização bem-sucedidas, pode ser citado o seu tipo de sistema reprodutivo, que pode ser por cruzamento ou endogamia. Se o ambiente não for propício para o cruzamento, ocorre endogamia, aumentando as suas chances de sobrevivência (SHARMA; SHARMA, 2019).

Outro fator que favorece a adaptação de *H. suaveolens* e competição nos ecossistemas é o seu efeito alelopático (KUMARI; PRASAD, 2018). Aleloquímicos liberados por *H. suaveolens* podem ser responsáveis pelo crescimento restrito de outras espécies de plantas próximas à sua colônia nos ecossistemas naturais (MOMINUL ISLAM; KATO-NOGUCHI, 2013). Até mesmo o tipo de propagação da espécie e o modo como esta ocorre contribui para a sua ampla ocorrência. De um modo geral, formas variadas de multiplicação auxiliam na dispersão de plantas (BRIGHENTI; OLIVEIRA, 2011).

Hyptis suaveolens pode ser propagada tanto por estacas, como por sementes. Para estaquia são utilizados ramos herbáceos, com comprimento que pode ser variável entre 5 e 20 cm (SILVA *et al.*, 2011). O enraizamento dessas estacas é superior a 86%, sendo elas apicais, medianas ou basais. Já a germinação das suas sementes ocorre na ausência de luz ou na presença de luz, é maior na presença de luz e sob a faixa de temperatura de 25-30°C. Nessa condição de luz e temperatura, a porcentagem de germinação de suas sementes chega a 90,50% (MAIA, S., *et al.*, 2008).

Apesar da faixa de temperatura ótima para a germinação das sementes de *H. suaveolens* ser de 25-30°C, estas podem germinar sob uma ampla faixa de 10 a 40°C. Além disso, em contato com a água, elas embebem-se liberando mucilagem leitosa com aspecto gelatinoso. A mucilagem funcionaria como um reservatório de água para a plântula, além de inibir o crescimento de fungos. Essas informações foram encontradas no trabalho de Felipe

et al. (1983) que descreveu detalhadamente fatores que afetam a germinação de sementes da espécie.

Hyptis suaveolens pode ser cultivada em vaso contendo areia e irrigado com solução nutritiva, como demonstrado por Gravena *et al.* (2002). Neste trabalho, plântulas da espécie foram cultivadas nesse sistema, em casa de vegetação (São Paulo, Brasil), nos meses de setembro a fevereiro. As plantas iniciaram o período reprodutivo entre 104 e 118 dias após a emergência da plântula (DAE), com o aparecimento de algumas flores. A maioria das flores não produziu frutos. A espécie apresentou acúmulo de biomassa seca total crescente até 145 DAE, quando, em seguida, se iniciou o processo de senescência. O ciclo total de crescimento de *H. suaveolens* foi de 145 dias (4,83 meses).

Também em relação ao florescimento e frutificação, *H. suaveolens* cultivada em canteiros localizados em Belém (Pará, Brasil), entre os anos de 2007 a 2008, floresceu nos meses de agosto a março, e frutificou de agosto a dezembro (LOPES; JARDIM, 2008). Apresentou comportamento clássico de uma planta de dias curtos, uma vez que o fotoperíodo mínimo de 16 horas inibiu a floração. Em adição, plantas de *H. suaveolens* cultivadas sob fotoperíodo natural (em casa de vegetação, Alfenas-MG-Brasil, entre os meses de agosto de 2003 e março de 2004) floresceram 50 dias após a sementeira (MARTINS; POLO, 2009).

Por outro lado, no trabalho de Oraon e Mondal (2018), *H. suaveolens* produziu flores de setembro a dezembro (em Santiniketan, Índia). As flores produzidas se abriram das 06:30 às 08:30h da manhã. Uma única flor produziu 2.430 ± 25 grãos de pólen e 3 mL de néctar. Assim que as flores começaram a abrir, diferentes membros da ordem *Hymenoptera*, *Diptera* e *Lepidoptera* foram encontrados visitando-nas. Entre os visitantes, as abelhas foram as mais dominantes.

Em relação à incidência de doenças, de acordo com Mendes e Urben (2018), *H. suaveolens* é planta hospedeira de *Colletotrichum* sp. (Mancha foliar), no estado da Bahia, e *Puccinia hyptidis* Mayor (Ferrugem), no estado de São Paulo. Guarnaccia *et al.* (2019) encontraram uma diversidade na composição de espécies de *Colletotrichum* recuperadas de plantas aromáticas e ornamentais da família Lamiaceae. Práticas agrícolas e vários fatores como temperatura, umidade e irrigação, além de mudanças climáticas, podem induzir condições adequadas para o desenvolvimento desta doença.

2.3 Composição química e aplicações potenciais de *Hyptis suaveolens*

Hyptis suaveolens é uma fonte importante de óleos essenciais, alcaloides, flavonoides, fenóis, saponinas, terpenos e esteróis. A espécie apresenta os diterpenos: ácido suaveólico, suaveolol, metil suaveolato, dois esteróides: β -sitosterol, β -sitosterol glicosídeo, dois constituintes fenólicos: ácido rosmarínico e metil rosmarinato, juntamente com alguns outros constituintes importantes, como ácido oleanólico ou ácido oleico e ácido ursólico (PRINCE *et al.*, 2013).

Foram isolados e identificados, por uma combinação de técnicas cromatográficas, compostos químicos de partes aéreas e raízes de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Oito compostos foram isolados das partes aéreas de *H. suaveolens*: quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo (1), apigenina (2), metil wogonin (3), quercetina (4), kaempferol (5), genkwanin (6), ácido rosmarínico (7) e metilrosmarinato (8). Dois compostos foram isolados de raízes da espécie: PTOX (9) e picropodofilotoxina (10) (TANG *et al.*, 2019).

Em relação à composição química de folhas de *H. suaveolens*, no extrato hexânico, foram encontrados cumarina, flavonoides, pholobatanins, saponinas e taninos. No extrato de acetona: ácidos aromáticos, carboidratos, glicosídeos cardíacos, cumarinas, óleo essencial, flavonoides, grupos fenólicos, pholobatanins, açúcares redutores, saponinas, taninos e terpenoides. No extrato clorofórmico das folhas, cumarinas, flavonoides, grupos fenólicos, pholobatanins, açúcares redutores, saponinas, taninos e xanthoproteínas. No extrato metanólico, aminoácidos, ácidos aromáticos, carboidratos, glicosídeos cardíacos, cumarinas, flavonoides, grupos fenólicos, pholobatanins, saponinas, esteroides, taninos, terpenoides e xanthoproteínas. No extrato aquoso: aminoácidos, carboidratos, glicosídeos cardíacos, óleos essenciais, grupos fenólicos, pholobatanins, quinonas, açúcares redutores, saponinas, taninos, terpenoides e xanthoproteínas (AZHAGU *et al.*, 2017).

Como exemplo de análise de composição química volátil da espécie, pode ser citado o trabalho de Kossouh *et al.* (2010), no qual os autores analisaram o óleo essencial de folhas e frutos frescos por CG-EM. Os constituintes majoritários encontrados foram classificados como derivados de sesquiterpenos (β -cariofileno, trans- α -bergamoteno, biciclogermacreno e α -humuleno) e álcoois (terpinen-4-ol e trans- α -bergamotol). O rendimento dos óleos foi abaixo de 0,1%.

Asha, Mathew e Rishad (2015) avaliaram o teor de flavonoides e a atividade antioxidante do extrato metanólico da parte aérea de *H. suaveolens*. Primeiramente, por meio

de estudo preliminar, identificaram-se no extrato as seguintes classes de constituintes químicos: taninos, saponinas, flavonoides, esteroides, triterpenoides, glicosídeos cardiotônicos e alcaloides. Em relação aos flavonoides, os autores encontraram em *H. suaveolens* ácido gálico, ácido ferúlico, quercetina, ácido clorogênico e rutina. O extrato metanólico apresentou eficiência de 35,76% de inibição de radical livre (DPPH).

Edeoga, Omosun e Uche (2006) estudaram a composição química de extrato aquoso de folhas de *H. suaveolens*. Determinaram a porcentagem de alcaloides brutos (14,32%), fenóis (0,05%), taninos (0,52%), flavonoides (12,54%) e saponinas (0,3%). Investigaram, além disso, a composição dos principais elementos minerais de amostras de plantas da espécie, encontrando: 1,8% de K, 2,28% de nitrogênio, 1,06% de Ca, 0,67% de Mg, 0,46% de Na e 0,79% de P. Assim como também descreveram composição centesimal que indicou: 4,70% de umidade, 95,30% de matéria seca, 9,04% de fibra bruta, 14,22% de proteína bruta, 5,68% de cinzas, 4,46 % de lipídeos, 66,61% de carboidratos e 363,43 mg cal⁻¹ de energia alimentar.

A composição química de *H. suaveolens* confere a espécie diversas aplicações. Nas regiões nordeste e central do Brasil, *H. suaveolens* é utilizada tradicionalmente para tratar inflamação e aliviar sintomas relacionados à úlcera gástrica ou gastrite. Esse uso popular corrobora o trabalho de Jesus *et al.* (2013), no qual o extrato etanólico padronizado e a fração hexânica da parte aérea de *H. suaveolens* foram avaliados em vários modelos de úlcera gástrica aguda. Os resultados mostraram que ambas as preparações, nas concentrações de 62,5; 125; 250 e 500 mg kg⁻¹, administradas via oral a roedores, proporcionaram atividade gastroprotetora.

Em relação a novas aplicações da espécie demonstradas por pesquisas recentes, as sementes de *H. suaveolens* apresentam globulinas 11S, que tem potencial para ser ingrediente termoestável em sistemas alimentares. Em adição, a mucilagem dessas sementes apresenta muitas aplicações na área de alimentos, tais como agente estabilizante, espessante e gelificante. Ressalta-se que devido ao crescimento populacional e às preferências alimentares emergentes (ex: veganos e vegetarianos), tem sido necessário obter novos ingredientes alimentares e produtos à base de plantas com menor custo (DE LA CRUZ-TORRES *et al.*, 2017; PÉREZ-OROZCO; SÁNCHEZ-HERRERA; ORTIZ-BASURTO, 2019).

As sementes de *H. suaveolens* apresentam ainda propriedades nutricionais. Em geral, com exceção da lisina, possuem uma composição de aminoácidos bem equilibrada, fornecendo um bom suprimento de quase todos os aminoácidos essenciais para os diferentes

grupos etários. O teor de magnésio pode ser alto, já o de cálcio, potássio e fósforo, podem estar presentes em quantidade média, quando comparados à cevada, aveia, arroz e trigo (AGUIRRE *et al.*, 2012).

As sementes de *H. suaveolens* também são utilizadas como principal fonte de substância refrescante de bebida em várias regiões de Taiwan. Investigaram seus metabólitos secundários e isolaram cinco principais derivados do ácido cafeoilquínico do seu extrato etanólico. Dentre os isolados, 4,5-dicafeoilquinato de sódio e 3,5-dicafeoilquinato de metila apresentaram atividade inibitória moderada contra xantina oxidase. Análise quantitativa por CLAE do extrato etanólico indicou que o teor de 3,5-dicafeoylquinato de sódio e 4,5-dicafeoylquinato de sódio foi de 0,1% e 0,08% (p/p, semente seca), respectivamente. Os autores demonstraram o potencial da semente da espécie como nutracêutico anti-hiperuricêmico (HSU; TSAI; LEE, 2019).

Além das sementes, a parte aérea de *H. suaveolens* também apresenta aplicações potenciais. As infecções bacterianas do trato urinário são causadas por uropatógenos com *quorum sensing* (QS). Estes uropatógenos têm habilidades de formação de biofilme dependente. A interrupção de QS podem ser uma nova abordagem para combater resistência. Os extratos metanólico e hexânico derivado do metanólico, de folhas de *H. suaveolens*, exibiram atividade anti-QS contra a cepa biossensora *Chromobacterium violaceum*. Além disso, o extrato hexânico de *H. suaveolens* inibiu a formação de biofilme por uropatógenos como *Escherichiacoli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* (SALINI *et al.*, 2015).

Botcha e Prattipati (2019) investigaram a síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso de folhas de *H. suaveolens* e avaliaram a sua citotoxicidade contra células cancerígenas. A formação das nanopartículas após a incubação de AgNO₃ com extrato de folhas foi identificada pela mudança de cor (amarelo a marrom), e confirmada ainda pelo pico de absorvância visível no UV a 436 nm. O ensaio mostrou atividade citotóxica proeminente de G.S.AgNPs contra células PC-3 e MDA-MB 231 com valores de IC₅₀ de 63,16 e 52,49 µg ml⁻¹, respectivamente. A pesquisa demonstrou, claramente, a síntese eficiente de nanopartículas de prata, que pode ter um escopo para a aplicação na terapia do câncer.

Hyptis suaveolens é fonte de agentes antimicrobianos. Um total de 20 isolados bacterianos endofíticos foram obtidos de tecidos foliares esterilizados da superfície da espécie. Os isolados foram classificados como espécies do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* e

selecionados quanto à atividade antimicrobiana contra alguns patógenos clinicamente significativos (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*), por métodos de inoculação e difusão de disco. O resultado indicou que 60% dos isolados apresentaram inibição da atividade antimicrobiana em pelo menos um dos patógenos teste. Da mesma forma, 20% dos isolados demonstraram atividade anticandidíase, enquanto 10% deles apresentaram atividade antimicrobiana inibindo todos os patógenos testados (DAS *et al.*, 2017).

Chatri, Handayani e Primayani (2019) estudaram o efeito de *H. suaveolens* na inibição do crescimento de *Sclerotium rolfsii*. Extrato foliar da espécie foi preparado pelo método de maceração utilizando etanol a 96%. A solução do extrato foi concentrada utilizando evaporador rotativo a vácuo. As concentrações utilizadas foram 0% (controle), 5%, 10%, 15% e 20% com 4 repetições. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de folhas de *H. suaveolens* (L.) Poit. pode inibir o crescimento de *S. rolfsii* e a concentração mais efetiva foi na concentração de 15% com 58% de porcentagem de inibição.

Outra potencial aplicação da parte aérea da espécie é o uso desta como um bioherbicida. De acordo com Kumari e Prasad (2018), os lixiviados foliares de *H. suaveolens* apresentam efeito inibitório tanto em *Parthenium hysterophorus* L. quanto em *Senna uniflora* (Mill.). Além disso, extratos aquosos foliares de *H. suaveolens* em concentrações de 1 a 5% inibem fortemente outras ervas daninhas, como *Alternanthera sessilis*, *Echinochloa colona* e *Cyperus rotundus*.

Esta inibição do crescimento de plantas pelo extrato aquoso foliar de *H. suaveolens* pode ocorrer devido ao fato da espécie apresentar ácido suaveólico em sua composição, que é uma substância fitotóxica. O extrato aquoso metanólico dessa planta foi purificado por várias execuções cromatográficas. A purificação final de uma substância fitotóxica foi alcançada por CLAE de fase reversa e caracterizada como ácido suaveólico. O ácido suaveólico inibiu o crescimento de brotos de agrião, alface (*Lactuca sativa*), azevém (*Lolium multiflorum*) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) em concentrações superiores a 30 µM (ISLAM *et al.*, 2014).

O óleo essencial de *H. suaveolens* apresenta efeito inseticida e repelente. Adjou, Chougourou e Soumanou (2019) avaliaram os efeitos inseticidas e repelentes do óleo essencial de folhas frescas da espécie contra *Tenebroides mauritanicus* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae) isolados de amendoim em pós-colheita. A análise química do óleo essencial por CG/EM indicou que estavam presentes diferentes grupos de terpenos e terpenoides. A uma concentração de 0,5 µl de óleo essencial / g de amendoim, a taxa de mortalidade de *T.*

mauritanicus foi de 100% após 24 horas. De acordo com o estudo, o óleo essencial de *H. suaveolens* possui atividade repelente. Este óleo essencial com propriedades repelentes e inseticidas representa uma possível proteção de grãos contra *T. mauritanicus* e a redução de perdas pós-colheita.

Hyptis suaveolens também apresenta aplicação potencial na metalurgia. O extrato aquoso de folhas de *H. suaveolens* como inibidor de corrosão em H₂SO₄ 1 M foi avaliado. O extrato demonstrou eficiência para inibir o processo de corrosão em H₂SO₄ 1 M e a eficiência aumentou com o aumento da concentração do extrato. A eficiência máxima de inibição do extrato em 1 M H₂SO₄ encontrada foi de 95%. A natureza do filme protetor formado na superfície do aço leve foi confirmada por FT-IR, XRD e SEM técnicas. Este estudo mostra, claramente, a eficiência do extrato para controle de corrosão de aço em soluções 1 M de H₂SO₄ (MUTHUKRISHNAN; JEYAPRABHA; PRAKASH, 2014).

Por fim, em relação ao assunto de pesquisa do presente trabalho, *H. suaveolens* tem potencial aplicação no combate a células cancerosas. Lautié *et al.* (2008) verificaram a presença de podofilotoxina (PTOX) em raízes da espécie. Essa substância é uma lignana que também pode ser encontrada no gênero *Podophyllum* e outros, e mostra potente atividade antitumoral (MEDRADO *et al.*, 2015). Porém, devido à sua toxicidade e baixa solubilidade em água, a PTOX tem aplicação limitada como medicamento anticâncer (ZI *et al.*, 2019).

2.4 Podofilotoxina (PTOX): ocorrência, biossíntese e farmacologia

Podofilotoxina é uma lignana ariltetralina. A comercialização dessa substância obtida por síntese química é restrita, devido ao seu alto custo de produção. Assim, PTOX é extraída de plantas. Ocorre em espécies dos gêneros *Podophyllum*, *Sinopodophyllum* e *Dysosma* (Berberidaceae), *Juniperus* e *Callitris* (Cupressaceae), *Hyptis*, *Nepeta*, *Salvia*, *Teucrium* e *Thymus* (Lamiaceae), *Linum* (Linaceae), dentre outros. Em todos esses gêneros, exceto em *Podophyllum*, há relatos de que a PTOX é encontrada na raiz e nas folhas, não somente na raiz. Para atender às crescentes necessidades farmacêuticas, espécies que contêm PTOX são muito exploradas e se tornam ameaçadas. O que levou a estudos para identificar novas formas de produção, como cultivo *in vitro* de células ou de órgãos vegetais (ARDALANI; AVAN; GHAYOUR-MOBARHAN, 2017; KUMARI; SINGH; KUMAR, 2017; LIU *et al.*, 2014).

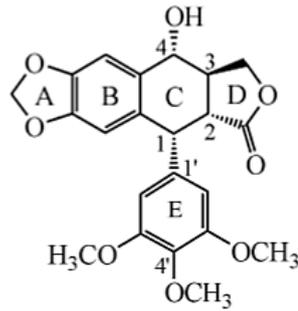
O termo PTOX é derivado de espécies do gênero *Podophyllum*, como por exemplo, *P. peltatum* e *P. hexandrum*. Essas plantas foram utilizadas no passado como plantas medicinais com ações catárticas e colagogas. As suas raízes e rizomas fornecem uma resina obtida por

extração com etanol, a podofilina. Essa resina foi a forma terapêutica mais utilizada no século XIX. Em 1872, já se havia observado que extratos das duas espécies de *Podophyllum* eram tóxicos a mucosas. Esses extratos foram retirados de Farmacopeias, mas em seguida, um estudo descreveu o uso bem sucedido da podofilina por meio do seu uso tópico para tratar condilomas venéreos. Esse resultado criou a possibilidade do uso da podofilina contra tecidos cancerosos. A partir dessa descoberta, a química e a atividade antineoplásica dos componentes da podofilina foram bastante estudadas. O isolamento da PTOX ocorreu em 1880 (MEDRADO *et al.*, 2015).

O processo de amostragem, armazenamento e pré-tratamento de amostra são cruciais para a análise de lignanas, uma vez que reações químicas indesejadas, como oxidação, degradação térmica, ou polimerização de lignanas sensíveis podem ocorrer. Extração sequencial com um solvente não-polar, seguido por extração com acetona ou etanol, é recomendado para separar as lignanas da matriz da planta. Etapas adicionais de hidrólise ácida, alcalina ou enzimática podem ser necessárias para algumas matrizes de plantas, mas deve-se ter cuidado para que produtos químicos não alterem a lignana analisada. CLAE é a técnica analítica mais frequentemente utilizada para lignanas, uma vez que geralmente não é necessário nenhum pré-tratamento demorado das amostras. Colunas de fase reversa são normalmente utilizadas para fins analíticos, uma vez que a maioria das lignanas estudadas são de polaridade média (WILLFÖR; SMEDS; HOLMBOM, 2006).

A estrutura química da PTOX (FIGURA 2) tem sido elucidada há muitos anos. Essa lignana apresenta quatro centros quirais em uma fileira - a partir de C-1 a C-4 e um sistema de cinco anéis (A, B, C, D e E). As características estruturais essenciais de muitas espécies de PTOX são: grupo tetracíclico ABCD quase planar indo a partir do anel de dioxol ao anel de lactona, quatro extremidades com átomos de oxigênio com grupos funcionais dioxóis, metóxidos, lactona, e álcool secundário, um anel E aromático localizado na posição 1 com configuração α e uma ligação com um certo grau de rotação livre (ARORA, 2010; BORSCHE; NIEMANN, 1932; YOU, 2005).

Figura 2 - Estrutura química da podofilotoxina.

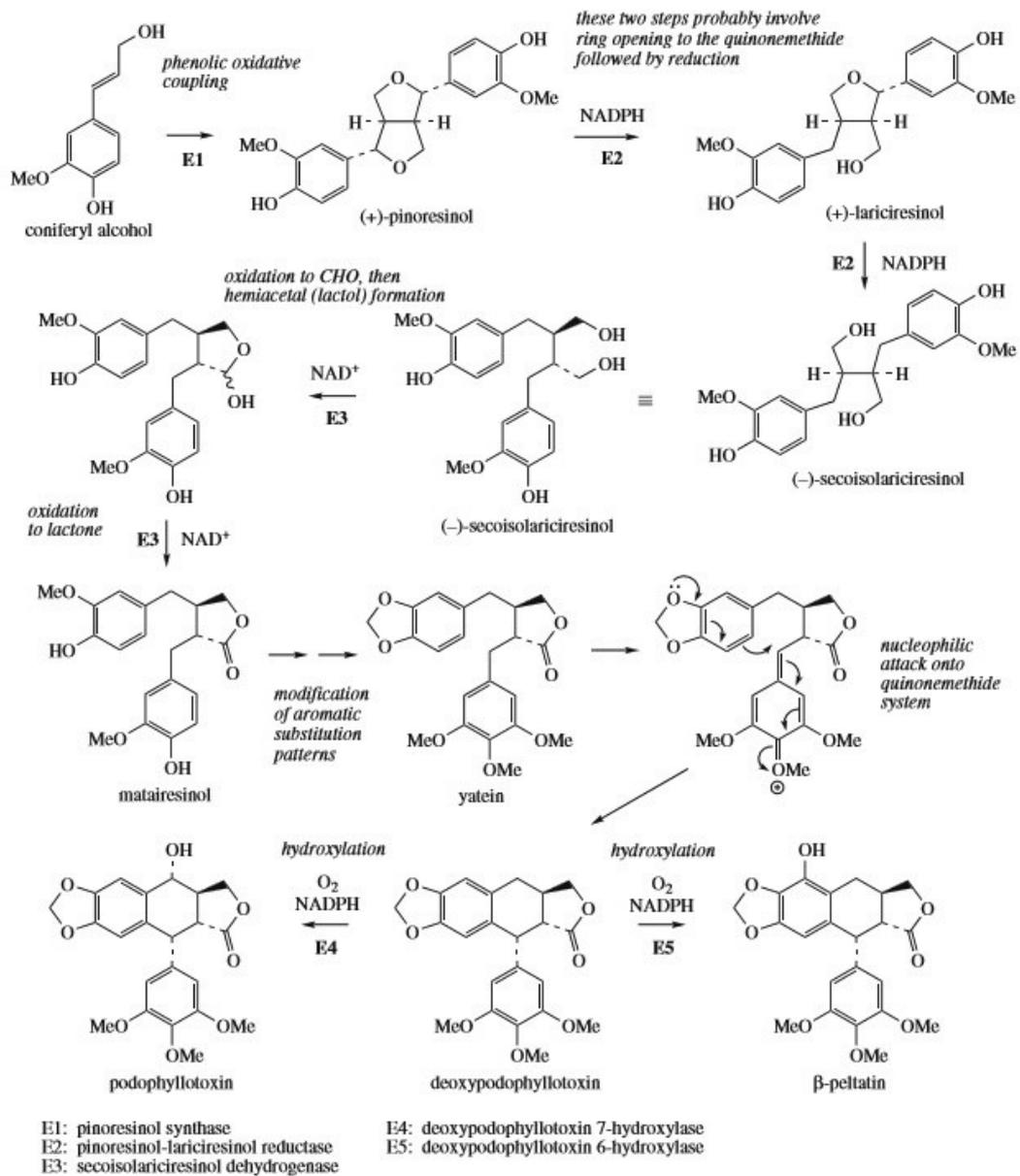


Fonte: Guerram, Jiang e Zhang (2012).

Conforme descrito anteriormente, PTOX é uma lignana e pertence à classe dos fenilpropanoides. Lignanas são definidas como produtos da dimerização de duas unidades de fenilpropanos (C_6C_3)₂ via rota do ácido chiquímico. Vários estudos têm investigado a biossíntese de PTOX e têm sugerido uma rota comum começando do álcool coniferil que é convertido à pinoresinol na presença de um oxidante através da dimerização do radical estereoespecífico intermediário. Pinoresinol é, então, seletivamente reduzido na presença do cofator NADPH e gera o primeiro lariciresinol seguido pelo secoisolariciresinol. Dehidrogenação de secoisolariciresinol forma matairesinol que é considerado como o precursor da PTOX. O matairesinol é convertido à yateína e em seguida à PTOX (GUERRAM; JIANG; ZHANG, 2012; SUZUKI; UMEZAWA, 2007).

Em 1980, Dewick e coautores conduziram uma série de experimentos e revelaram as rotas de yateína a PTOX via deoxipodofilotoxina. Os autores também mostraram que matairesinol é metabolizado a PTOX e propuseram yateína como possível intermediário entre matairesinol e PTOX. A enzima que converte yateína em deoxipodofilotoxina ainda é desconhecida (SUZUKI; UMEZAWA, 2007). Na Figura 3, a seguir, está representada a biossíntese de PTOX (DEWICK, 2009).

Figura 3 - Biossíntese de podofilotoxina.

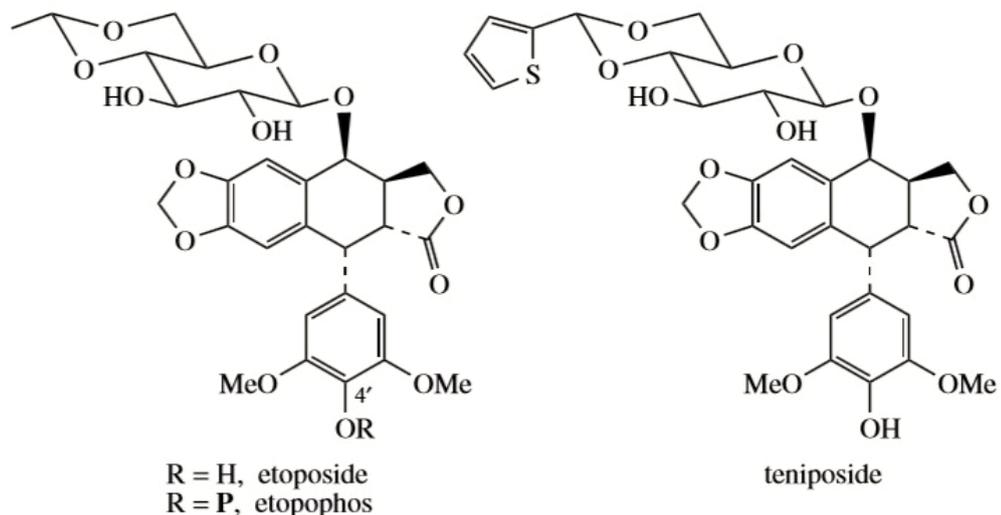


Fonte: Dewick (2009).

Podophyllum hexandrum, espécie ameaçada de extinção, é uma das principais fontes de PTOX. A demanda industrial dessa lignana depende apenas de recursos naturais altamente ameaçados. Estudos moleculares podem fornecer uma compreensão mais aprofundada da sua biossíntese e regulação. Isso permitirá ainda a seleção dos genótipos de elite e genes em potencial que podem ser direcionados para aprimorar a produção e o rendimento de PTOX em escala industrial. Análises de expressão comparativa revelaram que 12 dos 31 genes da biossíntese de PTOX são regulados positivamente no rizoma. No entanto, as vias chiquimato e fenilalanina, que geram precursores de PTOX, são abundantemente reguladas em folhas (NAG *et al.*, 2020).

A PTOX apresenta atividade citotóxica contra várias linhagens celulares cancerosas, inibindo a montagem de microtúbulos. No entanto, ela carece de especificidade tumoral e sua alta toxicidade para células normais impede seu uso (ZI *et al.*, 2019). Modificações no esqueleto de PTOX levam ao desenvolvimento de derivados utilizados terapêuticamente que apresentam potente atividade citotóxica com poucos efeitos colaterais. Os derivados semissintéticos de PTOX, como etoposide, teniposide e etopophos (FIGURA 4) apresentam modo de ação distinto, com potente atividade inibitória da enzima DNA topoisomerase II que previne a religação do DNA e não são inibidores dos microtúbulos (LOIKE *et al.*, 1978; WIGLEY, 1995).

Figura 4 - Etoposide, teniposide e etopophos.



Fonte: Dewick (2009).

Podofilotoxina apresenta outras atividades biológicas. É antiviral, antirreumática e inseticida. Está em uso clínico como antiviral no tratamento de verrugas venéreas causadas pelo vírus do papiloma. No entanto, a principal bioatividade que atraiu a atenção dos cientistas foi sua citotoxicidade descrita no século XX. Como resultado, a PTOX tornou-se um composto atraente para a fabricação de medicamentos anticâncer e atualmente, vários derivados semissintéticos estão em uso clínico para o tratamento de uma variedade de doenças malignas. Um dos seus derivados mais recentes é o tafluposide, que inibe a topoisomerase I e II (CASTRO *et al.*, 2015).

Verrugas anogenitais são a manifestação de uma infecção sexualmente transmissível de tipos específicos de papilomavírus humano (HPV). Medicamentos tópicos são tratamentos

indicados para redução e eliminação dessas verrugas, tais como podofilina, ácido tricloroacético, fluoruracila, PTOX e imiquimode. Os dois primeiros somente podem ser aplicados por profissionais médicos e os demais podem ser aplicados pelo próprio paciente. Crioterapia, eletrocauterização e excisão cirúrgica são procedimentos utilizados para a remoção ou destruição das lesões. No Brasil, há registro sanitário para PTOX 1,5 mg g⁻¹ (ou 0,15%) ou imiquimode 5% (ou 50 mg g⁻¹). No SUS, estão disponíveis podofilina, em concentrações variando entre 100 mg mL⁻¹ e 250 mg mL⁻¹ (ou 10% a 25%), e os procedimentos de excisão cirúrgica e de tratamento geral de infecção (BRASIL, 2018).

Para o medicamento PTOX de uso tópico faltam dados que permitam avaliar a segurança fetal do seu uso durante a gravidez. Foi investigada a associação entre a exposição local à PTOX durante a gravidez e o risco de efeitos fetais adversos. As análises de sensibilidade incluíram uma comparação de gestações expostas à PTOX com gestações com uso de PTOX somente antes do início da gravidez. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre a exposição à PTOX durante a gravidez e os principais defeitos congênitos, abortos espontâneos, nascimentos prematuros ou nascidos mortos (ANDERSSON; ANDERSEN, 2020).

2.5 Cultivo *in vitro* de plantas e produção de podofilotoxina (PTOX)

As técnicas de cultura *in vitro* produzem plantas livres de doenças, possibilitam rápida multiplicação, transformam genomas e produzem metabólitos de valor comercial. Esses metabólitos tipicamente apresentam estrutura química complexa, com síntese química desafiadora. Portanto, são mais comumente extraídos de suas fontes naturais. No entanto, a maioria das plantas de origem desses metabólitos é selvagem. A colheita em seus habitats naturais apresenta risco de superexploração. Além disso, em seu ambiente, as plantas podem apresentar baixas taxas de crescimento, baixas concentrações de compostos e necessidade de estresse para induzir a biossíntese. Assim, a sua produção é ineficiente. Avanços na cultura vegetal *in vitro* resultaram na mudança da produção de substâncias medicinais do estágio experimental para o industrial (ESPINOSA-LEAL; PUENTE-GARZA; GARCÍA-LARA, 2018).

Além disso, podem existir restrições ambientais e regionais para o cultivo *in vivo* de plantas e a produção de metabólitos por elas. Culturas *in vitro* podem ser estabelecidas em qualquer parte do mundo e em qualquer época. Além das vantagens mencionadas, existem metabólitos que geralmente não são encontrados na planta *in vivo*, mas podem ser produzidos

nas culturas *in vitro*. A produção pode ser realizada utilizando-se calos, culturas de suspensão celular ou estruturas organizadas como brotos, raízes e embriões somáticos. Em alguns casos, pode ser necessário um certo grau de diferenciação para que ocorra a biossíntese da substância de interesse. O uso de culturas diferenciadas é necessário, por exemplo, quando o metabólito é produzido apenas em tecidos ou glândulas especializadas de plantas, como é o caso de óleos (GONÇALVES; ROMANO, 2018).

Em muitas plantas cultivadas *in vitro*, o rendimento de metabólitos secundários pode ser maior nas raízes adventícias ou transformadas que em outras partes vegetais. Estas podem, até mesmo, produzir metabólitos que a planta mãe não produz, conforme citado anteriormente. Portanto, a tecnologia de cultura de raiz é atrativa para maior produção dos metabólitos. Podem ser culturas de raízes transformadas ou não, havendo possibilidade de aplicação comercial. No entanto, existem desafios para aplicação dessa técnica. Existe especificidade de células, órgãos e tecidos para a biossíntese de metabólitos. Em muitas plantas, os metabólitos são sintetizados em certas células especializadas e translocados para outras ou para outros órgãos de armazenamento (ISAH *et al.*, 2018).

Poucos produtos naturais são sintetizados em tecidos radiculares, e a maioria é produzida em estruturas aéreas. Além disso, outro problema potencial é que alguns produtos naturais sintetizados pela raiz são frequentemente translocados para longe de seu local de produção através do floema ou xilema para tecidos de drenagem distantes, onde são armazenados para defesa química. São exemplos de produtos naturais sintetizados e acumulados nas raízes: escopolamina, atropina, antraquinona, alcaloides indólicos e glicosídeos cardíacos (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, pesquisadores têm otimizado as condições de cultivo *in vitro* no geral, produzindo metabólitos por meio da otimização de fatores bióticos e abióticos, como temperatura, umidade, intensidade de luz, meio de cultura, aeração, etc, ou por meio da aplicação de seleção de linhagem celular, elicitação e alimentação precursora. Os esforços são feitos com a possibilidade de ampliar a produção, atender à demanda da indústria farmacêutica e conservar as fontes naturais das moléculas. As aplicações de engenharia metabólica também têm recebido atenção crescente (CHANDRAN *et al.*, 2020; EBRAHIMI; MOKHTARI, 2017; ISAH, 2017; SINGH; SHARMA, 2020).

Assim como existem vantagens, existem limitações para a produção *in vitro* de metabólitos. Podem ser destacados o baixo rendimento de biomassa e os maiores custos de produção, devido às condições ambientais controladas e à necessidade de mão de obra

especializada. Assim, em várias espécies de plantas medicinais, a maioria das técnicas *in vitro* ainda é mais apropriada somente para pesquisar e entender os fatores que afetam a produção de compostos. A obtenção *in vitro* destes pode ser adequada no caso de substâncias raras e de alto valor comercial. Dessa forma, os custos podem ser diluídos em sistemas de grande escala (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019; CRESCENCIO *et al.*, 2014).

Podofilotoxina é um metabólito de alto valor comercial. Assim, as técnicas de cultivo *in vitro* podem ser aplicadas para sua produção. Em revisão de literatura, observou-se que pesquisadores utilizam auxinas para o aumento da biomassa e produção de PTOX. Como exemplo, Karuppaiya e Tsay (2020) verificaram que o meio B5 com 1 mg L⁻¹ de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), juntamente com 2 g L⁻¹ de peptona, produziu mais biomassa de calos foliares e melhorou a produção de PTOX (16,3 vezes) pela espécie *D. pleiantha*.

A auxina 2,4-D é a mais empregada nos processos de calogênese. Ela estimula o início da divisão celular e atua controlando o crescimento por meio do aumento da produção de RNA polimerase, estimulando a produção de RNA e biossíntese de proteínas de crescimento. Assim, na presença de 2,4-D, as células do explante passam pelo processo de desdiferenciação, seguidas da divisão (PINTO *et al.*, 2016). Além disso, apresenta atividade na promoção do enraizamento lateral e na inibição do alongamento radicular (TOFANELLI; FREITAS; PEREIRA, 2014).

No geral, reguladores de crescimento de plantas não apenas controlam o crescimento e o desenvolvimento, eles também regulam a produção de metabólitos secundários. Possibilitam a produção de compostos medicinais específicos, a uma taxa comparável ou até maior que a de plantas intactas (JAMWAL; BHATTACHARYA; PURI, 2018). Por outro lado, peptonas são hidrolisados de proteínas formados por digestão enzimática ou ácida, de várias matérias-primas, e meios de cultura complexos contêm peptonas como fonte de nitrogênio (LINK; WEUSTER-BOTZ, 2011).

Esfandiari *et al.* (2018) avaliaram o teor de lignanas em raízes cultivadas *in vitro*, e de diversas partes vegetais de plantas selvagens de *L. persicum*. Tratamentos com ácido naftaleno-acético (ANA) (2 mg L⁻¹) aumentaram a formação de raízes e reduziram o teor de lariceresinol. Entretanto, aumentaram os teores de PTOX e matairesinol. Em relação à quantificação de lignanas nas plantas selvagens, as maiores concentrações de lariceresinol e PTOX foram obtidas nas capsulas das plantas. A maior concentração de pinoresinol foi observada nas raízes e nas folhas, e matairesinol nos caules.

O uso adequado de auxina desempenha um papel fundamental no enraizamento de muitas espécies, pois pode aumentar a quantidade de carboidratos transportados para a estaquia e formação de raízes adventícias. Em plantas ornamentais, os reguladores de crescimento mais utilizados são ácido indol butírico (AIB), ácido indol acético (IAA) e ANA. Essas substâncias reguladoras de crescimento são usadas para produzir estacas com altas taxas de enraizamento, acelerar o enraizamento e aumentar o número de raízes por estaca (AKAT; DEMIRKAN; TUNA, 2017).

Rajesh *et al.* (2014) estudaram o estabelecimento de embriogênese somática e produção de PTOX por embriões da espécie *P. hexandrum*. Os autores estabeleceram cultura de embriões em suspensão. Calos embriogênicos de embriões zigóticos foram induzidos em meio MS contendo $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D sob ausência de luz. Para iniciar a cultura embriogênica em suspensão, 100 mg de matéria fresca de calos embriogênicos foram colocados em 30 ml de meio líquido MS suplementado com 2,4-D ou ANA sob diferentes concentrações (0,5 - 3 mg/l) e 3 g L^{-1} de PVP em Erlenmeyer de 150 ml. O maior teor de PTOX ($2,3 \text{ mg g}^{-1}$ de matéria seca) foi obtido com cultura embriogênica em suspensão no meio MS líquido com 0,75 da força, contendo 1 mg L^{-1} de giberelina (GA_3), depois de 2 semanas de cultura.

Bazaldúa *et al.* (2019) estabeleceram linhagens de raízes transformadas de *H. suaveolens in vitro*, por meio da infecção com *Agrobacterium rhizogenes* dos explantes nodais que as originaram. A linhagem HsTD10 foi a que apresentou a maior produção de PTOX. O meio MS a 75% de seus componentes com a adição de 2 mg L^{-1} de tiamina, possibilitou o melhor resultado. Foi observado que o acúmulo de PTOX estava associado ao crescimento das raízes. A taxa de crescimento específico (μ) foi de 0,11 d⁻¹. A maior concentração de PTOX obtida com HsTD10 ($5,6 \text{ mg g}^{-1}$ matéria seca) foi 100 vezes maior que a relatada para raízes de plantas silvestres e 56 vezes maior que a encontrada para raízes não transformadas *in vitro* de *H. suaveolens*.

Há casos em que o uso de reguladores de crescimento pode ser dispensado para a produção de PTOX. Meira *et al.* (2017) cultivaram *in vitro* segmentos nodais de *L. macrostachys* sob diferentes condições e avaliaram PTOX. Realizaram-se esquema fatorial duplo com 2 fatores: concentrações de benzilaminopurina (BAP) (0; 4,44 e 8,88 μM) e ANA (0; 5,37 e 10,74 μM) e tratamentos adicionais: controle, $\frac{1}{2}$ MS com 15 g de sacarose, $\frac{1}{2}$ MS com 30 g de sacarose, MS com 15 g de sacarose, MS com 30 g de sacarose. Dentre os

tratamentos, o tratamento $\frac{1}{2}$ MS com 15 g de sacarose, possibilitou maior concentração de PTOX nas plântulas ($5,83\text{mg g}^{-1}$ de matéria seca de planta).

Velóz, Cardoso-Taketa e Villarreal (2013) avaliaram raízes de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro*, em meio líquido MS, sem fito-hormônios. Estas acumularam PTOX a 0,013% da matéria-seca, enquanto em três linhagens celulares de culturas de calos que cresceram juntas com raízes, a PTOX acumulou-se nas concentrações de 0,003, 0,005 e 0,006% de matéria-seca quando ANA foi combinado com CIN ou BAP. No material vegetal selvagem, a PTOX estava presente em quantidades vestigiais nas partes aéreas, enquanto nas raízes foi encontrada a 0,005% de matéria seca.

Em relação ao uso de precursores, a fenilalanina (FA) foi utilizada para estimular a produção de PTOX em culturas de calos e suspensão de células de *J. virginiana*. Nos calos, após a aplicação de FA (10 mmol/L) por 21 dias, foi determinado um teor de $0,15\text{ mg g}^{-1}$ de PTOX na matéria seca. Essa concentração de PTOX foi cerca de 400% maior em comparação ao controle. Em culturas de células em suspensão recém-derivadas, o teor máximo de PTOX ($0,48\text{ mg g}^{-1}$ matéria seca) foi induzido por aplicação de FA durante 14 dias, a uma concentração de 1 mmol L^{-1} . Este resultado foi cerca de 243% maior que o controle (KAŠPAROVÁ *et al.*, 2017). Na Tabela 1, a seguir, estão descritos de forma resumida os tratamentos, parte vegetal utilizada na extração, método extrativo e de análise de PTOX, bem como os resultados dos trabalhos citados neste tópico (2.5).

Tabela 1 - Descrição resumida dos trabalhos citados no tópico (2.5).

(Continua)

Espécie vegetal	Tratamentos de cultura de tecidos	Parte vegetal utilizada na extração de PTOX	Método extrativo de PTOX	Método de análise de PTOX	Concentração de PTOX obtida	Referência
<i>L. persicum</i>	Cultivo de segmentos nodais em 2 mg L ⁻¹ ANA	Raiz	2 g de peso fresco + 5 mL de metanol 80%, sonicação por 1 h, + 2 mL de diclorometano, + 4 mL de água destilada, vortexar, recolher a fase inferior, evaporar ao ar	CLAE, coluna C18OD53 (4,6 µm /250 nm); comprimento de onda 290 nm	0,01 mg g ⁻¹ de matéria fresca de raiz	Esfandiari <i>et al.</i> (2018)
<i>P. hexandrum</i>	Obtenção de embriões somáticos em meio MS com 5 mg L ⁻¹ de GA ₃	Embriões somáticos	Realizado conforme descrito por Uden <i>et al.</i> (1989), com modificações	CLAE, coluna Luna® de fase reversa C18 (5 µm; 30 × 4,6 mm); Eluição isocrática com metanol e água (65:35 v / v); Fluxo: 1,0 ml min ⁻¹ ; comprimento de onda de 250 nm	1,8 mg g ⁻¹ de matéria seca de embriões	Rajesh <i>et al.</i> (2014)
<i>H. suaveolens</i>	Cultivo de folhas e segmentos intermodais infectados com <i>A. rhizogenes</i> em meio semissólido com 2 mg L ⁻¹ de ANA e 1 mg L ⁻¹ de BAP	Raízes transformadas	Realizado conforme Koulman <i>et al.</i> (2003); 80:20 v/v metanol/diclorometano	Cromatografia líquida ultra rápida; fase móvel: A) Água com 0,2% de ácido acético, B) Acetonitrila com 0,2 % de ácido acético; fluxo de 0,3 mL min ⁻¹ ; (A: B): 0-20 min 100: 0 ; 20-55 min 82:18; 55-80 min 70:30; e 80-90 min 0: 100; estável por 5 minutos. Temperatura do amostrador: 20 ° C; Temperatura da coluna: 30 ° C. TR da PTOX = 18,82 minutos	5,341 mg g ⁻¹ de matéria seca de raiz + 4,79 mg g ⁻¹ de matéria seca de meio de cultura	Bazáldua <i>et al.</i> (2014)

Tabela 1 - Descrição resumida dos trabalhos citados no tópico (2.5).

(Continuação)

Espécie vegetal	Tratamentos de cultura de tecidos	Parte vegetal utilizada na extração de PTOX	Método extrativo de PTOX	Método de análise de PTOX	Concentração de PTOX obtida	Referência
<i>Leptohyptis macrostachys</i>	Meio ½ MS, 15 g de sacarose	Não informada	2 g de material seco + 15 mL de etanol, sob agitação, por 2 h, a 40 °C. Filtragem do extrato, secagem, ressuspensão e partição com H ₂ O e acetato de etila (1:1), evaporação do solvente	CLAE Coluna RP18-e (50 mm × 4 mm i.d.) (3 µm), eluição gradiente: solvente A (MeOH: H ₂ O: AcOH 14: 85: 1) e solvente B (ACN). Inicialmente, um A mistura de A e B (8: 2) foi eluída por 8 min, diminuindo progressivamente a 7,8: 2,2 e 7: 3 aos 12 minutos e 5,5: 4,5 aos 18 minutos. A análise completa durou 22 min, com fluxo de 0,8 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 2 µL à temperatura ambiente, comprimento de onda 290 nm.	5.8309 mg g ⁻¹ de matéria seca de planta	Meira <i>et al.</i> (2017)

Tabela 1 - Descrição resumida dos trabalhos citados no tópico (2.5).

(Conclusão)

Espécie vegetal	Tratamentos de cultura de tecidos	Parte vegetal utilizada na extração de PTOX	Método extrativo de PTOX	Método de análise de PTOX	Concentração de PTOX obtida	Referência
<i>H. suaveolens</i>	10 g de raízes em meio líquido MS, sem fito-hormônios; Cultivo de explantes retirados de ramos laterais em diferentes concentrações de reguladores	Raízes	Maceração com clorofórmio a 100% durante 6 dias, filtragem e destilação sob pressão reduzida.	CLAE, coluna C18 (5 µm, 4,6 × 250 mm) com uma eluição isocrática de acetonitrila: água com ácido acético a 0,2% (40:60), fluxo 1 mL / min, e volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda 291,3 nm. TR PTOX = 13 minutos	Raízes sem fitormônios: 0,013% da matéria seca; sem PTOX no meio; 0,006% da matéria seca (ANA + CIN ou ANA + BAP); Em calos que cresceram junto com raízes: 0,003, 0,005 e 0,006% da matéria seca; em raízes selvagens 0,005% da matéria seca.	Velóz, Cardoso-Taketa e Villarreal (2013)
<i>J. virginiana</i>	Calos: aplicação de fenilalanina (FA) (10 mmol L ⁻¹) por 21 dias; Cultura de células: aplicação de FA durante 14 dias	Culturas de calos e suspensão de células	500 mg de material vegetal + 10 mL de metanol 100%, sob ultrassom por 1 h a 30°C	CLAE-DAD, 280 nm, coluna 250 x 4 mm, 5 µm, vol. Inj. 20µL., Temp. col. 25°C. Fase móvel A: metanol, água e ácido fosfórico (60: 39,7: 0,3) e B: metanol e ácido fosfórico (99,7:0,3) em gradiente 0 - 8 min, 0 - 80%; 8 - 9 min, 80 - 100%; 9 - 10 min, 100%; 10 - 11 min, 100% - 0%; 11 - 13 min, 0% of solvent B., fluxo 1 mL min ⁻¹	Calos: 0,15 mg g ⁻¹ matéria seca; Culturas de células em suspensão: 0,48 mg g ⁻¹ matéria seca	Kašparová et al. (2017)

Fonte: Da autora (2020).

2.6 Validação de método analítico através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Validação de método analítico é o processo utilizado para confirmar que o procedimento empregado para a análise de uma substância de interesse apresenta qualidade, confiabilidade e resultados consistentes. Os métodos precisam ser validados ou revalidados (PATIL; AHIRRAO; PAWAR, 2017). A revalidação é necessária quando o escopo do método validado foi alterado, por exemplo, se as condições operacionais mudaram (PATEL; PATEL; GAJRA, 2011). A aprovação de produtos pelas autoridades regulamentadoras exige que o solicitante prove o controle de todo o processo de desenvolvimento. A validação do método resulta em métodos oficiais de testes e controle de qualidade (RAVISANKAR *et al.*, 2015).

Dados de validação analítica são aplicados na indústria farmacêutica, de pesticidas, dentre outras áreas (RAO, 2018). Existem diversos documentos de referência para validação de métodos, incluindo informações sobre diferentes parâmetros de desempenho. As características clássicas de desempenho são seletividade, precisão, linearidade, exatidão, robustez, limite de quantificação e limite de detecção (RAPOSO; BIANCO, 2020). Os parâmetros de desempenho e protocolos estatísticos seguidos ao longo de um estudo de validação variam de acordo com a fonte de diretrizes (RUIZ-ANGEL *et al.*, 2014).

Validar um método é um procedimento demorado, que requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos. No intuito de padronizar os procedimentos, a IUPAC ("*International Union of Pure and Applied Chemistry*") publicou um guia para calibração em Química Analítica. As agências regulamentadoras dos Estados Unidos ("FDA, *Food and Drug Agency*"), Japão (MHLW, "*Ministry of Health, Labour and Welfare*") e União Europeia (EMA, "*European Medicine Agency*") passaram a organizar a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, "*International Conference on Harmonisation*"), para estabelecer padrões para os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) (RIBEIRO; FERREIRA, 2008).

Em território brasileiro, a utilização de método analítico não descrito em compêndio oficial reconhecido pela Anvisa requer a realização de uma validação analítica conforme parâmetros estabelecidos na resolução 166 de RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017,

levando-se em consideração as condições técnico-operacionais. Essa resolução é aplicável a métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção (BRASIL, 2017).

Com a criação da política nacional de medicamentos e, conseqüentemente, com a implantação dos genéricos no Brasil, o acesso aos medicamentos pela população tornou-se mais amplo e intenso, acarretando em maiores preocupações para os órgãos sanitários, que passaram a exigir cada vez mais dos fabricantes farmacêuticos a comprovação da qualidade de seus produtos, em termos de segurança e eficácia (JESUS *et al.*, 2013; SANTOS; BARROS; OLIVEIRA, 2016).

O processo de identificação e quantificação de substâncias de interesse em produtos vegetais inclui o uso de cromatografia. Existem diferentes tipos de técnicas cromatográficas, como, por exemplo, a cromatografia em papel, a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida, acromatografia em camada fina, acromatografia de troca iônica e líquida de alto desempenho (CLAE) (THAMMANA, 2016).

CLAE é uma forma de cromatografia em coluna que bombeia em alta pressão uma amostra (analito) dissolvida em um solvente (fase móvel) através de uma coluna com um material de embalagem cromatográfico imobilizado (fase estacionária). As propriedades da amostra e do solvente, bem como a natureza da fase estacionária, determinam o tempo de retenção dos analitos. À medida que a amostra passa pela coluna, os analitos com as interações mais fortes com a fase estacionária saem da coluna mais lentamente, o que significa que exibem tempos de retenção mais longos. Ao sair da coluna, a fase móvel passa por um módulo de detecção, como um fluorímetro ou detector de absorvância de UV (PETROVA; SAUER, 2017).

No caso de PTOX, estão disponíveis na literatura métodos analíticos validados. Entretanto, especificamente para a sua obtenção a partir de *H. suaveolens*, a literatura carece de dados. Sharma, Sharma e Bhardwaj (2018) determinaram um método de CLAE com detecção UV para quantificação de PTOX em *P. hexandrum*. A PTOX foi extraída de raízes secas pulverizadas (1g), utilizando-se como solvente metanol e o procedimento foi realizado em aparelho soxhlet por duas horas. A fase móvel utilizada foi metanol: água (62:38, v / v). A detecção de UV foi empregada em 280 nm, a eluição isocrática, a uma taxa de fluxo de 0,9 ml / min. O volume de injeção foi 20 µl. O tempo total de execução do padrão foi de 22 minutos com o tempo de retenção da PTOX $9,45 \pm 0,017$ min (média \pm desvio padrão da análise em triplicata). A linearidade incluiu uma faixa de concentração de 42,5-850 ($\mu\text{g mL}^{-1}$), a equação

de regressão foi $Y=1,68e+004X+2,61e+0,005$ e o coeficiente de correlação 0,998. A porcentagem de recuperação de PTOX foi analisada em três níveis, obtendo-se os valores: 96,67%, 98,83% e 99,91%. A precisão intra-dia teve desvio de 0,66%, inter-dia de 0,68% e o limite de detecção foi $0,026 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o de quantificação $0,106 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Kamal *et al.* (2017) validaram método de cromatografia em camada fina de alto desempenho (HPTLC) para a quantificação de PTOX em *P. hexandrum*. O método desenvolvido foi validado de acordo com as diretrizes do ICH (ICH, 2005). Para a extração de PTOX, utilizaram-se raízes secas e pulverizadas (60 g). O solvente utilizado foi metanol (250 mL) e o procedimento foi realizado em soxhlet aparelho em banho-maria por 6 h. A fase móvel teve a composição de diclorometano: metanol e ácido fórmico na proporção de 9,5: 0,5: 0,5, v / v / v. Em relação à linearidade, encontraram a faixa de concentração de 150-2400 ng.spot⁻¹. O coeficiente de correlação foi $0,99271 \pm 0,00013$, a equação de regressão: $Y=1143,86 + 3,39 * X$, o limite de detecção $45,7 \text{ ng spot}^{-1}$ e o limite de quantificação $138,7 \text{ ng. spot}^{-1}$. A precisão instrumental encontrada foi 1,03-1,80 (% RSD). A exatidão do método foi verificada por estudos de recuperação conduzidos em três níveis de concentração diferentes e a recuperação percentual média encontrada foi de 100,71%.

As razões para o desenvolvimento de novos métodos de análise de medicamentos são: quando não há medicamento oficial ou combinação de medicamentos disponível nas farmacopeias; quando não houver processo analítico para o medicamento existente na literatura devido a regulamentação de patentes, quando não houver métodos analíticos para a formulação do medicamento devido à interferência causada pelos excipientes da formulação e quando métodos analíticos para a quantificação do analito em fluidos biológicos não estão disponíveis. Em adição, na situação em que os procedimentos analíticos existentes precisam de reagentes e solventes caros, bem como procedimentos pesados de extração e separação. Por fim, destaca-se que a análise farmacêutica moderna deve levar um tempo mínimo e ser econômica (RAVISANKAR *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS

- ADJOU, E. S.; CHOUGOUROU, D.; SOUMANOU, M. M. Insecticidal and repellent effects of essential oils from leaves of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum canum* against *Tenebroides mauritanicus* (L.) isolated from peanut in post-harvest. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, Berlin, v. 14, n. 1, p. 25-30, 2019.
- AGUIRRE, C. *et al.* Analysis of protein fractions and some minerals present in chan (*Hyptis suaveolens* L.) seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 1, p. 15-19, 2012.
- AKAT, H.; DEMIRKAN, G. C.; TUNA, A. L. The effect of naphthalene acetic acid and some rooting media on rooting abilities and shoot growth of Dwarf Nerium cuttings. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 38, n. 5, p. 903-909, 2017.
- ANDERSSON, N. W.; ANDERSEN, J. T. Association between fetal safety outcomes and exposure to local podophyllotoxin during pregnancy. **JAMA Dermatology**, Chicago, v. 156, n. 3, p. 303-311, 2020.
- ARDALANI, H.; AVAN, A.; GHAYOUR-MOBARHAN, M. Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, Pardis, v. 7, n. 4, p. 285-294, 2017.
- ARORA, R. **Medicinal plant biotechnology [M]**. Wallingford: CAB International, 2010.
- ASHA, D.; MATHEW, L.; RISHAD, K. S. Evaluation of HPTLC fingerprints of flavonoids and antioxidant activity of selected medicinal plants of Lamiaceae family. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, Lisse, v. 7, n. 2, p. 240-245, 2015.
- AZHAGU, R. R. *et al.* Preliminary phyto-chemical analysis and biological activity of *Hyptis suaveolens* (L.) (Lamiaceae). **Pharma Innovation**, New Delhi, v. 6, n. 7-H, p. 1032-1038, 2017.
- BARBOZA, J. N. *et al.* An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v. 2018, Oct. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6217746>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- BASÍLIO, I. J. L. D. *et al.* Comparative pharmacobotanical study of the leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.
- BAZALDÚA, C. *et al.* Improving the production of podophyllotoxin in hairy roots of *Hyptis suaveolens* induced from regenerated plantlets. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 9, 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0222464>. Acesso em: 10 mar. 2020.

BAZALDÚA, C. *et al.* Podophyllotoxin-like lignans production through hairy roots of *hyptis suaveolens*. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, Peshawar, v. 4, n. 5, p. 37-47, Nov. 2014.

BORSCHÉ, W. E.; NIEMANN, J. Uber Podophyllin [J]. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, Leipzig, v. 494, p. 126-142, 1932.

BOTCHA, S.; PRATTIPATI, S. D. Green synthesis of silver nanoparticles using *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaf extracts, their characterization and cytotoxicity evaluation against PC-3 and MDA-MB 231 cells. **Biologia**, Zürich, v. 74, p. 795-796, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017**. Determinar a publicação do "Guia para Validação de Métodos Analíticos". Brasília, DF, 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 10 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para atenção integral às pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST)**. Brasília, DF: MS, 2018.

BRIGHENTI, A. M.; OLIVEIRA, M. F. **Biologia de plantas daninhas**. Brasília, DF: Ed. Embrapa, 2011.

CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B. S. de; CARDOSO, F. de C. I. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 2, p. 124-132, 2019.

CAROVIĆ-STANKO, K. *et al.* Medicinal plants of the family lamiaceae as functional foods: a review. **Czech Journal of Food Sciences**, Prague, v. 34, n. 5, p. 377-390, 2016.

CASTRO, M. A. *et al.* An overview on heterocyclic podophyllotoxin derivatives. **Targets in Heterocyclic Systems**, London, v. 19, p. 28-61, 2015.

CHANDRAN, H. *et al.* Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. **Biotechnology Reports**, New York, v. 26, p. e00450, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X20300060?via%3Dihub>. Acesso em: 10 nov. 2020.

CHATRI, M. *et al.* Leaf Trichomes Morphology of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (LAMIACEAE). **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, Philadelphia, v. 335, n. 1, 2018. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/335/1/012020>. Acesso em: 10 mar. 2020.

CHATRI, M.; HANDAYANI, D.; PRIMAYANI, S. A. The effect of *hyptis suaveolens* (l.) poit extract on the growth of *sclerotium rolfsii* with in-vitro. **Journal of Physics: Conference Series**, Philadelphia, v. 1317, n. 1, 2019. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1317/1/012081>. Acesso em: 10 mar. 2020.

CRESCENCIO, B. *et al.* Podophyllotoxin-Like Lignans Production through Hairy Roots of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, Dubai, v. 4, n. 5, p. 37-47, 2014.

DAS, I. *et al.* Bioactivities of bacterial endophytes isolated from leaf tissues of *Hyptis suaveolens* against some clinically significant pathogens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Gwalior, v. 7, n. 8, p. 131-136, 2017.

DE LA CRUZ-TORRES, L. F. *et al.* Physicochemical and functional properties of 11S globulin from chan (*Hyptis suaveolens* L. poit) seeds. **Journal of Cereal Science**, London, v. 77, p. 66-72, 2017.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. *In*: DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. New York: J. Wiley, 2009. p. 137-186.

EBRAHIMI, M.; MOKHTARI, A. Engineering of secondary metabolites in tissue and cell culture of medicinal plants: an alternative to produce beneficial compounds using bioreactor technologies. *In*: ABDULLAH, S. N. A.; CHAI-LING, H.; WAGSTAFF, C. (ed.). **Crop improvement: sustainability through leading-edge technology**. Zürich: Springer, 2017. p. 137-167.

EDEOGA, H. O.; OMOSUN, G.; UCHE, L. C. Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 10, p. 892-895, 2006.

ESFANDIARI, M. *et al.* Optimization of cell/tissue culture of *Linum persicum* for production of lignans derivatives including Podophyllotoxin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 133, n. 1, p. 51-61, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-017-1360-y>.

ESPINOSA-LEAL, C. A.; PUENTE-GARZA, C. A.; GARCÍA-LARA, S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, Berlin, v. 248, n. 1, p. 1-18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>.

FALCÃO, D.; MENEZES, F. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FATIH, B. *et al.* Chemical composition and biological activities of mentha species. *In*: EL-SHEMY, H. (ed.). **Aromatic and medicinal plants: back to nature**. London: IntechOpen, 2017. chap. 3.

FELIPPE, G. M. *et al.* Germinação da unidade de dispersão da erva invasora *Hyptis suaveolens*. *In*: SEMINARIO REGIONAL DE ECOLOGIA, 1983, Ciudad del México. **Anais [...]**. Ciudad del México: UNAM, 1983. p. 245-261.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. *In*: VIJAYAKUMAR, R.; RAJA, S. S. S. (ed.). **Secondary metabolites: sources and applications**. London: IntechOpen, 2018. chap. 5. DOI:

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76414>.

GRAVENA, R. *et al.* Análise do crescimento de *Hyptis suaveolens*. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 189-196, 2002.

GUARNACCIA, V. *et al.* Species diversity in *Colletotrichum* causing anthracnose of aromatic and ornamental Lamiaceae in Italy. **Agronomy**, Basel, v. 9, n. 10, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/9/10/613>. Acesso em: 10 mar. 2020.

GUERRAM, M.; JIANG, Z. Z.; ZHANG, L. Y. Podophyllotoxin, a medicinal agent of plant origin: past, present and future. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Beijing, v. 10, n. 3, p. 161-169, 2012.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.

HASE, T. *et al.* Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid β aggregation by increasing monoamine secretion. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-45168-1>.

HASSANEIN, H. D. *et al.* Profiling of essential oil chemical composition of some Lamiaceae species extracted using conventional and microwave-assisted hydrodistillation extraction methods via chemometrics tools. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 35, n. 3, p. 329-340, 2020.

HSU, F. C.; TSAI, S. F.; LEE, S. S. Chemical investigation of *Hyptis suaveolens* seed, a potential antihyperuricemic nutraceutical, with assistance of HPLC-SPE-NMR. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taipé, v. 27, n. 4, p. 897-905, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.05.006>.

ISAH, T. Production of camptothecin in the elicited callus cultures of *Nothapodytes nimmoniana* (J. Graham) Mabblerly. **Chemical Papers**, Bratislava, v. 71, n. 6, p. 1091-1106, 2017.

ISAH, T. *et al.* Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 132, n. 2, p. 239-265, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-017-1332-2>.

ISLAM, A. K. M. M. *et al.* Suaveolic acid: a potent phytotoxic substance of *hyptis suaveolens*. **Scientific World Journal**, Cairo, v. 2014, 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/425942>. Acesso em: 10 mar. 2020.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, New York, v. 9, p. 26-38, May 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.003>.

JESUS, N. Z. T. *et al.* Hyptis suaveolens (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 150, n. 3, p. 982-988, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.010>.

KAMAL, A. *et al.* A validated HPTLC method for the quantification of podophyllotoxin in Podophyllum hexandrum and etoposide in marketed formulation. **Arabian Journal of Chemistry**, Riad, v. 10, p. S2539-S2546, 2017.

KARUPPAIYA, P.; TSAY, H. S. Enhanced production of podophyllotoxin, kaempferol, and quercetin from callus culture of Dysosma pleiantha (Hance) Woodson: an endangered medicinal plant. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 67, n. 1, p. 95-104, 2020.

KAŠPAROVÁ, M. *et al.* Production of podophyllotoxin by plant tissue cultures of Juniperus virginiana. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 12, n. 1, p. 101-103, 2017.

KLUMPP, D. A. *et al.* Synthesis of menthol glycinates and their potential as cooling agents. **ACS Omega**, Washington, DC, v. 5, n. 8, p. 4043-4049, 2020.

KOSSOUOH, C. *et al.* A comparative study of the chemical composition of the leaves and fruits deriving the essential oil of hyptis suaveolens (L.) poit. From Benin. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 22, n. 6, p. 507-509, 2010.

KOULMAN, A. *et al.* A phytochemical study of lignans in whole plants and cell suspension cultures of Anthriscus sylvestris. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, p. 733-738, 2003.

KOZŁOWSKA, M. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae family. **Acta Poloniae Pharmaceutica: Drug Research**, Warsaw, v. 72, n. 4, p. 757-767, 2015.

KUMAR, P. *et al.* Expression analysis of biosynthetic pathway genes vis-??-vis podophyllotoxin content in Podophyllum hexandrum Royle. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 252, n. 5, p. 1253-1262, 2015.

KUMARI, A.; SINGH, D.; KUMAR, S. Biotechnological interventions for harnessing podophyllotoxin from plant and fungal species: current status, challenges, and opportunities for its commercialization. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 37, n. 6, p. 739-753, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07388551.2016.1228597>.

KUMARI, J. A.; PRASAD, P. R. C. Assessing the allelopathy and autotoxicity effects of Parthenium hysterophorus L., Senna uniflora (Mill.) H.S. Irwin and Barneby and Hyptis suaveolens (L.) Poit. **Russian Journal of Biological Invasions**, Berna, v. 9, n. 3, p. 290-298, 2018.

KUSUMA, I. W. *et al.* Biological activities and phytochemicals of hyptis capitata grown in east kalimantan, indonesia. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, Gwalior, v. 8, n. 2, p. 58-64, 2020.

- LAUTIÉ, E. *et al.* Selection methodology with scoring system: application to Mexican plants producing podophyllotoxin related lignans. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 120, n. 3, p. 402-412, 2008.
- LEWU, M. N. *et al.* Comparative growth and yield of Taro (*Colocasia esculenta*) Accessions cultivated in the Western Cape, South Africa. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 19, n. 3, p. 589-594, 2017.
- LIMA, D. S. de *et al.* Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 8, n. 1, p. 17-21, 2017.
- LINK, H.; WEUSTER-BOTZ, D. Medium formulation and development. *In*: MOO-YOUNG, M. (ed.). **Comprehensive biotechnology**. 2nd ed. New York: Elsevier, 2011. v. 2, p. 119-134.
- LIU, W. *et al.* Genetic diversity and structure of *sinopodophyllum hexandrum* (royle) ying in the qinling mountains, china. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 10, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110500>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- LOIKE, J. *et al.* Structure-activity study of inhibition of microtubule assembly *in vitro* by podophyllotoxin and its congeners [j]. **Cancer Research**, Baltimore, v. 38, p. 2688-2693, 1978.
- LOPES, I. L. M.; JARDIM, M. A. G. Fenologia , biologia floral e germinação de plantas aromáticas : *Hyptis suaveolens* (L .) Poit . e *Mansoa standleyi* (Steyerm.) A. H. Gentry (Bignoniaceae) Museu Paraense Emilio Goeldi. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 4, p. 361-365, 2008.
- MAGNANI, C. *et al.* Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. **Analytical Methods**, London, v. 6, n. 10, p. 3203-3210, 2014.
- MAIA, S. *et al.* Germinação de sementes de *Hyptis suaveolens* (L.) POIT. (LAMIACEA) em função da luz e da temperatura. **Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 4, p. 212-218, out./dez. 2008.
- MARTINS, F. T.; POLO, M. Desenvolvimento reprodutivo de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.: relação entre fotoperíodo, densidade celular meristemática e padrão de expressão de um ortólogo putativo do gene *LEAFY* de *arabidopsis*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 131-142, 2009.
- MEDRADO, H. H. S. *et al.* Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 243-258, 2015.
- MEIRA, P. R. *et al.* Abiotic factors influencing podophyllotoxin and yatein overproduction in *Leptohyptis macrostachys* cultivated *in vitro*. **Phytochemistry Letters**, New York, v. 22, p. 287-292, July 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.10.016>.

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F. **Fungos relatados em plantas no Brasil: laboratório de quarentena vegetal**. Brasília, DF: Ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 7 nov. 2018.

MENEZES, C. W. G. *et al.* Biocontrol potential of methyl chavicol for managing *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), an important corn pest. **Environmental Science and Pollution Research**, Zürich, v. 27, p. 5030-5041, 2020.

MOMINUL ISLAM, A. K. M.; KATO-NOGUCHI, H. Plant growth inhibitory activity of medicinal plant *Hyptis suaveolens*: could allelopathy be a cause? **Emirates Journal of Food and Agriculture**, Abu Dhabi, v. 25, n. 9, p. 692-701, 2013.

MUTHUKRISHNAN, P.; JEYAPRABHA, B.; PRAKASH, P. Mild steel corrosion inhibition by aqueous extract of *Hyptis Suaveolens* leaves. **International Journal of Industrial Chemistry**, Berna, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2014.

NAG, A. *et al.* Spatial transcriptional dynamics of geographically separated genotypes revealed key regulators of podophyllotoxin biosynthesis in *Podophyllum hexandrum*. **Industrial Crops and Products**, London, v. 147, p. 112247, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112247>.

NGOZI, L. The efficacy of *hyptis suaveolens*: a review of its nutritional and medicinal applications. **European Journal of Medicinal Plants**, London, v. 4, n. 6, p. 661-674, 2014.

OCHOA-VILLARREAL, M. *et al.* Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**, London, v. 49, n. 3, p. 149-158, Mar. 2016.

OLIVEIRA, L. M. *et al.* Propagação vegetativa de *hyptis leucocephala* mart. Ex benth. E *hyptis platanifolia* mart. Ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 73-78, 2011.

ORAON, S.; MONDAL, S. Circadian atmospheric pollen incidence of *Hyptis Suaveolens* (L) Poit results and discussion. **Indian Journal of Aerobiology**, New Delhi, v. 31, n. 1, p. 23-27, 2018.

PADALIA, H.; SRIVASTAVA, V.; KUSHWAHA, S. P. S. Modeling potential invasion range of alien invasive species, *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. in India: Comparison of MaxEnt and GARP. **Ecological Informatics**, New York, v. 22, p. 36-43, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoinf.2014.04.002>.

PATEL, M.; PATEL, D. A.; GAJRA, B. Validation of analytical procedure: methodology. **International Journal of Pharmaceutical Innovations**, Berne, v. 1, n. 2, p. 45-50, Jan. 2011.

PATIL, S. T.; AHIRRAO, R. A.; PAWAR, S. P. A short review on method validation. **Journal of Pharmaceutical and BioSciences**, Noida, v. 5, n. 4, p. 30-37, Oct./Dec. 2017.

PÉREZ-OROZCO, J. P.; SÁNCHEZ-HERRERA, L. M.; ORTIZ-BASURTO, R. I. Effect of concentration, temperature, pH, co-solutes on the rheological properties of *Hyptis suaveolens* L. mucilage dispersions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 87, p. 297-306, July 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.004>.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular -c-di-GMP. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 1657, p. 33-43, 2017.

PINTO, D. I. J. G. e C. *et al.* Efeito do 2,4-D na indução de calos em *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith. **Anais dos Seminários de Iniciação Científica**, Feira de Santana, n. 20, p. 2-5, 2016.

PRINCE, S. P. *et al.* *Hyptis suaveolens* (L.) poit: a phyto-pharmacological review. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, New Delhi, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2013.

PRIYA, M. D. A review on the pharmacology and phytochemistry of folklore medicinal plants *hyptis suaveolens* (L.) Poit. **International Journal of Basic, Applied and Innovative Research**, Ekpoma, v. 4, n. 4, p. 108-117, 2015.

RAJESH, M. *et al.* Establishment of somatic embryogenesis and podophyllotoxin production in liquid shake cultures of *Podophyllum hexandrum* Royle. **Industrial Crops and Products**, London, v. 60, p. 66-74, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.046>.

RAO, T. N. Validation of analytical methods. *In*: STAUFFER, M. (ed.). **Calibration and validation of analytical methods: a sampling of current approaches**. London: IntechOpen, 2018. chap. 7.

RAPOSO, F.; BIANCO, C. I. Performance parameters for analytical method validation: controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, New York, v. 129, Aug. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993620301424>. Acesso em: 10 dez. 2020.

RAVISANKAR, P. *et al.* A review on step-by-step analytical method validation. **IOSR Journal of Pharmacy**, Gurgaon, v. 5, n. 10, p. 2250-3013, 2015.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RODRIGUES, A. C. *et al.* Efeito alelopático de folhas de bamburral [*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.] sobre a germinação de sementes de sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 487-493, 2012.

RUIZ-ANGEL, M. J. *et al.* Are analysts doing method validation in liquid chromatography? **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1353, p. 2-9, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.052>.

SAEIDNIA, S. *et al.* Presence of monoterpene synthase in four Labiatae species and Solid-Phase Microextraction- Gas chromatography-Mass Spectroscopy analysis of their aroma profiles. **Pharmacognosy Research**, Bangalore, v. 6, n. 2, p. 138-142, 2014.

SALINI, R. *et al.* Inhibition of quorum sensing mediated biofilm development and virulence in uropathogens by *Hyptis suaveolens*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 4, p. 1095-1106, 2015.

SANTANA, F. R. *et al.* Evaluation of the cytotoxicity on breast cancer cell of extracts and compounds isolated from *Hyptis pectinata* (L.) poit. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 34, n. 1, p. 102-109, 2020.

SANTOS, E. C.; BARROS, D. A. C.; OLIVEIRA, S. R. Validação de métodos analíticos na indústria farmacêutica. **Saúde e Ciência em Ação: Revista Acadêmica do Instituto de Ciências**, Goiânia, v. 2, n. 1, p. 93-113, jan./jul. 2016.

SHARMA, A. *et al.* Chemical profiling, cytotoxicity and phytotoxicity of foliar volatiles of *Hyptis suaveolens*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 171, p. 863-870, Jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.091>.

SHARMA, A. *et al.* The impact of invasive *Hyptis suaveolens* on the floristic composition of the periurban ecosystems of Chandigarh, northwestern India. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, New York, v. 233, p. 156-162, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2017.04.008>.

SHARMA, P.; SHARMA, N. Mating strategies in a ruderal weed: case history of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **Vegetos**, Zürich, v. 32, p. 564-570, 2019.

SHARMA, S.; SHARMA, Y. P.; BHARDWAJ, C. Development and validation of Hplc-Uv method for quantification of podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum* Royle. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New Delhi, v. 7, n. 2, p. 3748-3752, 2018.

SILVA, A. C. da *et al.* Comprimento de estacas na propagação vegetativa de bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 4, p. 191-194, 2011.

SILVA, N. L. *et al.* Determinação da atividade antioxidante e teor de flavonoides totais equivalentes em quercetina em folhas de *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf e *Melissa officinalis* lam. **Conexão Ciência**, Formiga, v. 12, n. 1, p. 46-53, 2017.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. **Secondary metabolites of medicinal plants: ethnopharmacological properties, biological activity and production strategies**. Berlin: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2020. v. 3.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Selection of high-yielding cell lines. *In*: SINGH, B.; SHARMA, R. A. **Secondary metabolites of medicinal plants**. New York: Wiley, 2020. chap. 3.15.

- SOBEH, M. *et al.* Thymus algeriensis and Thymus fontanesii: chemical composition, in vivo antiinflammatory, pain killing and antipyretic activities: a comprehensive comparison. **Biomolecules**, Berna, v. 10, n. 4, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/4/599>. Acesso em: 10 nov. 2020.
- SUZUKI, S.; UMEZAWA, T. Biosynthesis of lignans and norlignans. **Journal of Wood Science**, London, v. 53, n. 4, p. 273-284, 2007.
- TAFURT-GARCÍA, G.; JIMÉNEZ-VIDAL, L. F.; CALVO-SALAMANCA, A. M. Antioxidant capacity and total phenol content of Hyptis spp., capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales de hyptis spp., capacidade antioxidante e conteúdo de fenóis totais de Hyptis spp. **Revista Colombiana de Química**, Bogotá, v. 44, n. 2, p. 28-33, 2015.
- TANG, G. *et al.* Studies on the chemical compositions of Hyptis suaveolens (L.) Poit. **Journal of the Serbian Chemical Society**, Belgrade, v. 84, n. 3, p. 245-252, 2019.
- THAMMANA, M. A review on high Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis**, Noida, v. 5, n. 2, 2016. Disponível em: <https://www.rroj.com/open-access/a-review-on-high-performance-liquid-chromatography-hplc-.php?aid=80688>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- TOFANELLI, M. B. D.; FREITAS, P. L.; PEREIRA, G. E. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid as an alternative auxin for rooting of vine rootstock cuttings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 36, n. 3, p. 664-672, 2014.
- UDEN, W. van *et al.* Detection and identification of podophyllotoxin produced by cell cultures derived from Podophyllum hexandrum Royle. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, p. 165-168, 1989.
- URITU, C. M. *et al.* Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: a review. **Pain Research and Management**, London, v. 2018, 2018. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/prm/2018/7801543>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- VELÓZ, R.; CARDOSO-TAKETA, A.; VILLARREAL, M. Production of podophyllotoxin from roots and plantlets of Hyptis suaveolens cultivated in vitro. **Pharmacognosy Research**, Bangalore, v. 5, n. 2, p. 93-102, 2013.
- WIGLEY, D. B. Structure and mechanism of DNA topoisomerases. [J]. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 24, p. 185-208, 1995.
- WILLFÖR, S. M.; SMEDS, A. I.; HOLMBOM, B. R. Chromatographic analysis of lignans. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1112, n. 1/2, p. 64-77, 2006.
- XU, D. H. *et al.* The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three Hyptis species. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 51, n. 9, p. 1125-1130, 2013.
- YOU, Y. Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 11, n. 13, p. 1695-1717, 2005.

ZI, C. T. *et al.* Glucoside derivatives of podophyllotoxin: synthesis, physicochemical properties, and cytotoxicity. **Drug Design, Development and Therapy**, Auckland, v. 13, p. 3683-3692, 2019.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - VALIDAÇÃO ANALÍTICA E PRODUÇÃO DE PODOFILOTOXINA
EM CULTURA DE RAÍZES *IN VITRO* DE *Hyptis suaveolens***

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o
Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

RESUMO

Podofilotoxina (PTOX) é uma molécula antiviral, antirreumática e anticancerígena, obtida de fontes naturais, pois sua síntese química é de alto custo. Por ser obtida de fontes naturais, muitos esforços biotecnológicos têm sido feitos para maximizar sua produção. Nesse sentido, há necessidade do monitoramento dos teores de PTOX nas amostras em estudos, empregando-se um método de quantificação que garanta a confiabilidade e consistência dos resultados analíticos. Assim, no presente trabalho, objetivou-se desenvolver e validar um método analítico por CLAE-FR para quantificação de PTOX em raízes de *Hyptis suaveolens*, bem como avaliar o cultivo de raízes *in vitro* da espécie em meio líquido com diferentes concentrações de AIB e ANA e com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol. Para esse fim, o método analítico, desenvolvido e validado, seguiu as disposições da RDC ANVISA nº166, 24 de julho de 2017, possibilitando a quantificação de PTOX nas amostras de *Hyptis suaveolens*. Os resultados que atestam o método analítico são: seletividade (pureza de pico: >99%), adequabilidade do sistema ($R_s = 2,92$; $N=7064$; $k = 1,23$; $A_s=1,31$; $DPR = 0,61\%$), precisão intradia e interdia ($DPR = 2,43\%$ e $2,96\%$, respectivamente), linearidade ($R^2=0,997$), porcentagem de recuperação (90,47% a 101,85%), limites de quantificação (5,25 ng) e de detecção (0,5 ng). O cultivo de raízes *in vitro* em meio MS líquido contendo 1 mg L^{-1} de AIB + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA apresentou a maior matéria seca de raiz (248,76 mg), concentração de PTOX na raiz ($179,97 \mu\text{g g}^{-1}$), e no meio de cultura ($0,73 \mu\text{g mL}^{-1}$). No experimento com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol, o cultivo de raízes em meio MS líquido na concentração $\frac{1}{2}$ da original apresentou boa matéria seca de raiz (198,88 mg) e acúmulo de PTOX na raiz ($6,01 \mu\text{g g}^{-1}$). Neste ensaio, não foi encontrada PTOX no meio de cultura. Concluiu-se que o protocolo de cultivo de raízes de *H. suaveolens*, em meio MS líquido, suplementado com 1 mg L^{-1} de AIB + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA maximiza o acúmulo de raízes e produção desta lignana do tipo ariltetralina. Verificou-se também que existe a necessidade da presença de concentrações adequadas de vitaminas e mio-inositol no meio de cultura MS líquido para o cultivo das raízes e produção *in vitro* de PTOX.

Palavras-chave: Validação do método. Lignana. Cromatografia líquida. Cultura *in vitro*. Bamburral.

ABSTRACT

Podophyllotoxin (PTOX) is an antiviral, anti-rheumatic and anti-cancer molecule, obtained from natural sources, because its chemical synthesis is expensive. Then, many biotechnological efforts have been made to maximize its production. In this sense, there is a need to monitor the levels of PTOX in the samples under study, using a quantification method that guarantees the reliability and consistency of the analytical results. Thus, in the present work, the objective was to develop and validate an analytical method by HPLC-FR for quantification of PTOX in roots of *Hyptis suaveolens*, as well as to evaluate the *in vitro* cultivation of roots of the species in liquid medium with different concentrations of AIB and ANA and with different concentrations of vitamins and myo-inositol. With this objective, an analytical method was developed and validated, following the provisions of RDC ANVISA No. 166, July 24, 2017, allowing the quantification of PTOX in the samples of *H. suaveolens*. The results that attest to the analytical method are: selectivity (peak purity: > 99%), suitability of the system ($R_s = 2.92$; $N = 7064$; $k = 1.23$; $A_s = 1.31$; $DPR = 0, 61\%$), intraday and intermediary precision ($DPR = 2.43\%$ and 2.96% , respectively), linearity ($R^2 = 0.997$), recovery percentage (90.47% to 101.85%), Limits of quantification = 5,25 ng and detection = 0.5 ng. *In vitro* root cultivation in liquid MS medium containing 1 mg L^{-1} of IBA + 0.5 mg L^{-1} of ANA showed the highest root dry matter (248.76 mg), concentration of PTOX in the root ($179.97 \mu\text{g g}^{-1}$) and in the culture medium ($0.73 \mu\text{g mL}^{-1}$). In the experiment with different concentrations of vitamins and myo-inositol, the cultivation of roots in liquid MS medium, in their concentration $\frac{1}{2}$ of the original, presented good root dry matter (198,88 mg) and accumulation of PTOX in the root ($6,01 \mu\text{g g}^{-1}$). In this assay, PTOX was not found in the culture medium. It was concluded that the root cultivation protocol of *H. suaveolens*, in liquid MS medium, supplemented with 1 mg L^{-1} of IBA + 0.5 mg L^{-1} of ANA maximizes the root accumulation and production of this ariltetralina type lignan. It was also found that there is a need for the presence of adequate concentrations of vitamins and myo-inositol in the liquid MS culture medium for root cultivation and *in vitro* production of PTOX.

Keywords: Method validation. Lignana. Liquid chromatography. AIB. ANA. *In vitro* culture. Bamburral.

1 INTRODUÇÃO

Hyptis suaveolens (Lamiaceae), conhecida como bamburral ou erva-canudo, é uma espécie nativa da América tropical, mas que apresenta distribuição ampla, é considerada uma planta invasora (PADALIA; SRIVASTAVA; KUSHWAHA, 2014). Possui diversas aplicações nutricionais e medicinais (NGOZI *et al.*, 2014). É fonte importante de óleos essenciais, alcaloides, flavonoides, fenóis, saponinas, terpenos e esteróis (PRINCE *et al.*, 2013). Apresenta na sua parte aérea: quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo, apigenina, metil wogonin, quercetina, kaempferol, genkwanin, ácido rosmarínico e metilrosmarinato. Nas suas raízes, acumulam-se podofilotoxina (PTOX) e picropodofilotoxina (TANG *et al.*, 2019).

De acordo com Castro *et al.* (2015), PTOX é antiviral, antirreumática e anticancerígena. Estes autores relatam que PTOX é utilizada no tratamento de verrugas venéreas causadas pelo papiloma vírus humano (HPV). Além disso, afirmam que a sua citotoxicidade, descrita no século XX, caracteriza seu principal interesse científico. Como resultado, a PTOX tornou-se um composto atraente para a fabricação de medicamentos anticâncer e atualmente, vários de seus derivados semissintéticos estão em uso clínico para o tratamento de uma variedade de doenças malignas. Um dos seus derivados mais recentes é o tafluposide, que inibe a topoisomerase I e II.

A comercialização de PTOX obtida por síntese química é restrita, devido ao seu alto custo de produção. Assim, PTOX é extraída de plantas. Ocorre em espécies dos gêneros *Podophyllum*, *Sinopodophyllum* e *Dyosma* (Berberidaceae), *Juniperus* e *Callitris* (Cupressaceae), *Hyptis*, *Nepeta*, *Salvia*, *Teucrium* e *Thymus* (Lamiaceae), *Linum* (Linaceae), dentre outros. Para atender às crescentes necessidades farmacêuticas, espécies que contêm PTOX são muito exploradas, e, conseqüentemente, ameaçadas. Por isso, novas formas de produção, como cultivo *in vitro* de células ou de órgãos vegetais têm sido avaliadas por diversos grupos de pesquisa (ARDALANI; AVAN; GHAYOUR-MOBARHAN, 2017; KUMARI; SINGH; KUMAR, 2017; LIU *et al.*, 2014).

Segundo Isah *et al.* (2018), em muitas plantas cultivadas *in vitro*, o rendimento de metabólitos secundários pode ser maior nas raízes que em outras partes vegetais. Estas podem, até mesmo, produzir metabólitos que a planta mãe não produz. Portanto, a cultura de raízes *in vitro* é atrativa para maior produção dos metabólitos. Podem ser culturas de raízes transformadas ou não, havendo possibilidade de aplicação comercial. No entanto, existem desafios para aplicação dessa técnica, devido à especificidade de células, órgãos e tecidos para

a biossíntese de metabólitos. Os metabólitos secundários de plantas podem ser sintetizados em células especializadas e translocados para outras ou para outros órgãos de armazenamento.

A produção de metabólitos secundários *in vitro* é dependente da otimização de fatores bióticos e abióticos como temperatura, umidade, intensidade de luz, meio de cultura, aeração, aplicação de seleção de linhagem celular, elicitación e alimentação precursora. Diversos esforços têm sido empreendidos com o intuito de maximizar a produção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico, a fim de conservar as fontes naturais das moléculas terapêuticas (CHANDRAN *et al.*, 2020; EBRAHIMI; MOKHTARI, 2017; ISAH, 2017; SINGH; SHARMA, 2020). Entretanto, a fim de monitorar a produção de metabólitos secundários *in vitro* é necessário um procedimento de análise validado. A validação de um método analítico é o processo de demonstrar que um procedimento analítico é adequado para a finalidade pretendida (BRASIL, 2017).

Assim, no presente trabalho, objetivou-se desenvolver e validar um método analítico por CLAE-FR para quantificação de PTOX em raízes de *Hyptis suaveolens*, bem como avaliar o cultivo de raízes *in vitro* da espécie em meio líquido com diferentes concentrações de AIB e ANA e com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As plantas utilizadas nas etapas analíticas e doadoras de explantes para os experimentos de cultura de tecidos foram obtidas de sementes de *Hyptis suaveolens* cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras. Exsiccatas foram depositadas no Herbário ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil) sob o registro 20475, e também no Herbário SPF (Herbário da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil), sob o nome de coleta H.B. Andrade 1 (SPF).

Para a validação do método analítico de quantificação de PTOX, utilizou-se raízes de plantas cultivadas na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da UFLA, exceto nas fases de exatidão e robustez, nas quais utilizaram-se raízes adventícias oriundas de cultura de tecidos.

2.2 Químicos

Clorofórmio (estabilizado com amileno Synth[®] e Fmaia[®]), acetato de etila (Vetec[®]), álcool etílico absoluto (99,8%; Alphatec[®]), ácido fosfórico (Vetec[®]) e nitrito de sódio (97%), todos de grau P.A. Para preparo de tampão fosfato, utilizaram-se fosfato de potássio monobásico anidro (Sigma-Aldrich[®]), fosfato de potássio dibásico anidro (Qhemis) e hidróxido de potássio (Alphatec[®]). Para cromatografia líquida, utilizaram-se Acetonitrila (J.T.Baker[®]) e metanol (AppliChem Panreac[®]) grau CLAE, e Podofitoxina (PTOX) (Sigma-Aldrich[®], pureza declarada por CLAE $\geq 98\%$).

2.3 Otimização extrativa

A fim de estabelecer uma metodologia de preparo de amostra que maximizasse a extração de PTOX, com base em dados de literatura (VELÓZ; TAKETA; VILLAREAL, 2013; ZHELJAZKOV *et al.*, 2013) foi determinada uma condição efetiva para extrair a máxima quantidade de PTOX das raízes desidratadas de *Hyptis suaveolens*. O método de extração por sonicação utilizou 50 mg de raízes pulverizadas de *H. suaveolens* empregando diferentes solventes, tempos e ciclos de extração, conforme especificado na Tabela 1.

Nos procedimentos não tamponados foram empregados apenas os solventes de extração. Nos procedimentos tamponados os ciclos de extração foram realizados com a mistura binária tampão:solvente. Nas amostras preparadas com solventes imiscíveis com o tampão (acetato de etila e clorofórmio) foram recolhidos 400 µL da fase orgânica de cada ciclo de sonicação, e, nos procedimentos com dois ciclos, esses volumes foram reunidos. Nas amostras com etanol tamponado, devido a sua miscibilidade com tampão, foram recolhidos 400 µL do sobrenadante, seguindo o mesmo procedimento para os solventes imiscíveis com tampão. As fases orgânicas foram concentradas a 40 °C, em evaporador rotatório, sob pressão reduzida.

A eficiência da extração foi avaliada através da integração da área do pico correspondente a PTOX. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com dezoito tratamentos e três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F ($p < 0,05$) e as médias dos dados comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Condições de extração avaliadas para raízes de *H. suaveolens*.

(Continua)

Código	Extração por sonicação			
	Solvente	Volume de tampão* (µL)	Tempo (min)	Ciclo × volume de solvente (µL)
A115T	Acetato de etila	900	15	1 × 600
A215T	Acetato de etila	2 × 900	15	2 × 600 cada
A130T	Acetato de etila	900	30	1 × 600
A115	Acetato de etila	0	15	1 × 600
A215	Acetato de etila	0	15	1 × 600 cada
A130	Acetato de etila	0	30	1 × 600
C115T	Clorofórmio**	900	15	1 × 600
C215T	Clorofórmio	2 × 900	15	2 × 600 cada
C130T	Clorofórmio	900	30	1 × 600
C115	Clorofórmio	0	15	1 × 600
C215	Clorofórmio	0	15	2 × 600 cada
C130	Clorofórmio	0	30	1 × 600
E115T	Etanol absoluto	900	15	1 × 600

Tabela 1 - Condições de extração avaliadas para raízes de *H. suaveolens*.

(Conclusão)

Código	Extração por sonicação			
	Solvente	Volume de tampão* (μL)	Tempo (min)	Ciclo \times volume de solvente (μL)
E215T	Etanol absoluto	2×900	15	2×600 cada
E130T	Etanol absoluto	900	30	1×600
E115	Etanol absoluto	0	15	1×600
E215	Etanol absoluto	0	15	2×600 cada
E130	Etanol absoluto	0	30	1×600

Fonte: Da autora (2020).

*O tampão empregado foi o fosfato de potássio pH=7 (25 mM). **Clorofórmio estabilizado com amileno.

2.4 Análises de perfis cromatográficos por CLAE-FR

Perfis cromatográficos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) foram obtidos a fim de avaliar a complexidade química das amostras, assim como para identificar a presença e estimar a quantidade de PTOX nas mesmas. As análises qualitativas foram realizadas a partir da comparação dos tempos de retenção, espectros no UV e co-injeção com PTOX de referência. Enquanto as análises quantitativas empregaram a área relativa do pico cromatográfico correspondente a PTOX.

2.4.1 Preparo das amostras

Após obtenção dos extratos e concentração em evaporador rotatório (item 2.3), os extratos foram solubilizados em 1.000 μL de MeOH grau CLAE e sonicados por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram analisados por CLAE.

2.4.2 Condições cromatográficas

Perfis cromatográficos exploratórios foram obtidos para as amostras de *H. suaveolens*, empregando um sistema de cromatografia líquida Agilent 1200 Series (Agilent Technologies[®], Waldbronn, Alemanha) equipado com bomba quaternária (G1311A), sistema

de degaseificação (G13222A), amostrador automático ALS (G1322A), detector de arranjo de diodos (G1315D) e sistema de aquisição de dados operacionalizados pelo *software* OpenLAB. As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa Eclipse XDB-C18 (5 μm \times 150 mm \times 4,6 mm I.D.) (Agilent Technologies®, EUA), com fluxo de 1 mL min⁻¹, empregando gradiente linear descrito na Tabela 2. As análises foram realizadas a 40 °C, com detecção no comprimento de onda de 210 nm.

Tabela 2 - Gradiente linear de eluição empregado para registro dos perfis cromatográficos exploratórios por CLAE-FR.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
65	5	95
70	5	95
75	95	5
85	95	5

Fonte: Da autora (2020).

Legenda: A= água. B = acetonitrila. Ambos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico.

2.5 Desenvolvimento do método cromatográfico

2.5.1 Sistema cromatográfico

O sistema de cromatografia líquida empregado foi o mesmo descrito no item 2.4.2.

2.5.2 Preparo das amostras

Alíquotas de 50 mg de raízes de *H. suaveolens* foram extraídas por sonicação por 2 ciclos de 15 minutos, empregando em cada ciclo 900 μL de tampão fosfato de potássio pH=7 (25 mM) + 600 μL de clorofórmio. O volume de extrato clorofórmico de 400 μL de cada fase orgânica foi recolhido, reunidos e evaporados sob vácuo em evaporador rotatório, à temperatura máxima de 40 °C, e os resíduos foram dissolvidos em 1.000 μL de MeOH. Em seguida, a amostra foi transferida para microtubo e submetidas à sonicação por 2 minutos, seguida de centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi injetado automaticamente no cromatógrafo.

Ressalta-se que, na fase de desenvolvimento do método cromatográfico, foram empregados dois tipos de clorofórmio, pois não sabíamos, até então, que havia diferentes formas comerciais desse solvente orgânico. Em um primeiro momento, utilizamos clorofórmio estabilizado com amileno. Devido a não termos conseguido adquirir o mesmo produto, tivemos que adquirir uma marca diferente e, numa segunda fase, foi empregado clorofórmio não estabilizado com amileno.

2.5.3 Estabilidade química de PTOX após o preparo da amostra

A estabilidade química de PTOX em seis amostras preparadas (item 2.4.1) foi avaliada mantendo-se as soluções no carrossel do cromatógrafo, à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), as quais foram analisadas sequencialmente nos intervalos de 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 e 42 horas, empregando-se a condição descrita no item 2.4.2.

As concentrações do marcador químico foram calculadas em cada intervalo de tempo e submetidas à análise de variância pelo teste de F ($p < 0,05$); as médias ($n=6$) dos dados foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.5.4 Preparo da solução de referência (PTOX)

A massa de 1,2 mg da substância de referência, podofilotoxina (PTOX) foi pesada diretamente em microtubo. Em seguida, foi solubilizada em 1 mL de metanol grau CLAE e submetida à sonicação por 2 minutos. Em seguida, foi submetida à centrifugação a 10.000 rpm, por 10 minutos. A solução de PTOX ($1,2 \text{ mg mL}^{-1}$) foi injetada automaticamente no cromatógrafo.

2.5.5 Desenvolvimento da condição cromatográfica

O desenvolvimento da condição cromatográfica para a quantificação de PTOX partiu da análise do perfil exploratório obtido de amostras de raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas em casa de vegetação. O desenvolvimento dessa condição compreendeu a avaliação de parâmetros relacionados com a resolução do pico de interesse, empregando alterações nas proporções do modificador orgânico, temperatura, fluxo, modo de eluição (isocrático e gradiente linear) e inclinação do gradiente. As condições avaliadas estão sumarizadas na Tabela 3. A identificação dos picos correspondentes aos marcadores químicos nos

cromatogramas, em cada condição cromatográfica, foi feita a partir dos perfis espectrais no ultravioleta a 210 nm e pela co-injeção com substâncias de referência. Espectros no UV, na faixa de 205 a 400 nm, foram registrados on-line para o pico de interesse.

A seletividade do método foi avaliada pela homogeneidade espectral do pico corresponde a PTOX, no comprimento de onda de 210 nm. Essa análise foi realizada pela sobreposição dos espectros registrados nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos; foi considerado seletivo quando apresentou pureza espectral acima de 99,0%. Além da seletividade, durante o desenvolvimento do método, foi dada atenção à resolução (R_s) adequada de PTOX com picos vizinhos ($R_s \geq 1,5$).

Tabela 3 - Etapas do desenvolvimento do método cromatográfico.

Parâmetros do método cromatográfico												
T Min	Eluente (%)		Temp. °C/ Fluxo mL/min	T Min	Eluente (%)		Temp. °C/ Fluxo mL/min	T min	Eluente (%)		Temp. °C/ Fluxo mL/min	
	H ₂ O	ACN			H ₂ O	ACN			H ₂ O	ACN		
Condição experimental A			Condição experimental B			Condição experimental C						
0	70	30	40/1	0	70	30	40/1	0	50	50		
3	70	30		3	70	30		5	34	66		
10	10	90		10	5	95		8	5	95		
15	5	95		12	5	95		11	5	95		
20	70	30		16	70	30		13	50	50		
25	70	30		20	70	30		15	50	50		
Condição experimental D			Condição experimental E			Condição experimental F						
0	50	50	40/1	0	44	56	25/1	0	50	50		
4,5	25	75		3,5	25	75		3,5	25	75		
6	5	95		4,5	5	95		4,5	5	95		
8	5	95		6	5	95		6	5	95		
9,5	50	50		8	44	56		8	50	50		
12	50	50		10	44	56		10	50	50		
Condição experimental G												
0	50	50	25/1									
2,5	30	70										
5	5	95										
6	5	95										
8	50	50										
10	50	50										

Fonte: Da autora (2020).

Legenda: Eluentes*: A, água; B, acetonitrila. Todos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico. A detecção de PTOX foi realizada a 210 nm para todas as condições avaliadas.

2.6 Validação do método analítico

A validação do método cromatográfico desenvolvido (item 2.5.5) foi realizada segundo critérios do guia ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH, 1996) e da Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017).

O programa OpenLab EZChrom[®] versão A.04.07 (Agilent) foi usado para aquisição e processamento dos dados. As análises estatísticas foram feitas nos programas Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation, 2003), GraphPad Prism[®] versão 6.0 (Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA) e no *software* R.

2.6.1 Preparo da amostra

Os experimentos de otimização extrativa demonstraram que o clorofórmio é o solvente mais eficiente para a extração de PTOX. No entanto, como descrito no item 2.5.2 durante a etapa de desenvolvimento do método cromatográfico, houve necessidade de alterar a marca do clorofórmio. Quando o clorofórmio não estabilizado com amileno começou a ser utilizado (sem termos conhecimento desse aspecto) começaram a ocorrer diversos problemas durante o procedimento de preparo de amostra, como deformação e perfuração de microtubos, ocasionando perda de amostras e presença de precipitado.

Com isso, foi realizado um ajuste na metodologia de preparo da amostra para a etapa de validação do método analítico, a qual passou a utilizar apenas recipientes de vidro. A metodologia de extração empregando sonicação 2×15 min, tampão fosfato de potássio 25 mM e cloroformio foi mantida. No entanto, os volumes da solução tampão e do clorofórmio foram alterados. O método passou a empregar 5 mL de tampão fosfato e 5 mL de clorofórmio. Além disso, durante a etapa de robustez (com exatidão), verificou-se ser possível utilizar 25 mg de raiz para a extração. A Figura 1 descreve o método de preparação da amostra para a etapa da validação do método analítico.

Após a etapa r (FIGURA 1), o resíduo foi dissolvido em 1 mL de metanol grau CLAE, em banho de ultrassom, por 2 min. Em seguida, centrifugou-se a 10000 rpm por 10 min, e o sobrenadante foi injetado automaticamente no sistema de cromatografia líquida.

Figura 1 - Metodologia de preparo da amostra utilizada na etapa de validação do método analítico para quantificação de PTOX em raízes de *H. suaveolens*. Na robustez, verificou-se ser possível o uso de 25 mg de raiz pulverizada.

- | | | |
|---|---|---|
| a) 50 mg raiz seca pulverizada | b) Acondicionar em bequer de vidro (50mL) | c) Adicionar 5 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 (25mM) |
| d) Sonicar por 15 min | e) Adicionar 5 mL de clorofórmio | f) Sonicar por 15 min |
| g) Filtrar a vácuo | h) Transferir a solução filtrada para tubo de vidro fino e transparente | i) Retirar as raízes retidas no papel de filtração e voltar para o bequer correspondente |
| j) Retirar 3 mL da fase aquosa presente no tubo de vidro e adicionar sobre estas raízes | k) Sonicar por 15 min (raiz + fase aquosa) | l) Adicionar 5 mL de clorofórmio |
| m) Sonicar por 15 min | n) Filtrar a vácuo | o) Transferir o filtrado para outro tubo de vidro fino |
| p) Descartar dos tubos de vidro a fase aquosa, com pipeta de Pasteur | q) Pipetar de cada ciclo 1,25 mL da fase clorofórmica | r) Acondicionar em bequer de 50 mL as fases clorofórmicas reunidas (1º+2º ciclo), para concentração ao ar |



Fonte: Da autora (2020).

2.6.2 Condição cromatográfica estabelecida

A condição cromatográfica estabelecida para a quantificação de PTOX em raízes de *H. suaveolens* está descrita, a seguir, e na Tabela 4.

- Coluna: Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm d.i. 5 μm);
- Temperatura da coluna: 25 °C;
- Fase móvel: água Milli-Q e acetonitrila grau CLAE, ambas contendo 0,1% de ácido fosfórico, conforme condições da Tabela 4;
- Fluxo: 1 mL/min;
- Comprimento de onda de detecção: 210 nm;
- Volume de injeção: 10 μL.

Tabela 4 - Programa de eluição estabelecido para a quantificação de PTOX em extrato de raízes de *H.suaveolens*.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)	Modo de eluição
0	50	50	Gradiente
2,5	30	70	Gradiente
5	5	95	Gradiente
6	5	95	Isocrático
8	50	50	Gradiente
10	50	50	Isocrático

Fonte: Da autora (2020).

2.6.3 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela homogeneidade espectral do pico correspondente à PTOX a 210 nm. Essa análise foi realizada pela sobreposição de espectros registrados nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos, simultaneamente, em uma mesma condição cromatográfica. Cálculos matemáticos de pureza espectral foram determinados pelo *software* OpenLab EZChrom[®] (Agilent), considerando um pico puro quando os índices de similaridade espectral foram $\geq 99,0\%$.

2.6.4 Teste de adequabilidade do sistema

Os parâmetros de adequabilidade do sistema (*System Suitability Test*) foram calculados (resolução (R_s), fator de retenção (k), fator de assimetria (A_s), número de pratos teóricos (N) e DPR do tempo de retenção (TR) do pico correspondente a PTOX). Os dados foram obtidos pelo *System Suitability* do programa OpenLab EZChrom[®], de acordo com a *The United States Pharmacopoeia* (USP) (UNITED..., 2006), e os resultados expressos como valor médio de seis determinações. Para se estabelecer o tempo morto (t_0) da corrida cromatográfica, injetou-se no sistema, nas mesmas condições da análise, 10 μ L de solução de nitrito de sódio 0,01% (p/v) em metanol grau CLAE, mesmo solvente empregado na solubilização das amostras.

2.7 Precisão

A precisão foi avaliada conforme estabelecido pelo guia da ICH - *International Conference on Harmonisation* (ICH, 1996). A repetibilidade (precisão intradia) foi verificada por meio de seis determinações da área do pico de PTOX no extrato clorofórmico de *H. suaveolens* ($n=6$). A precisão intermediária (precisão interdia) foi determinada de maneira semelhante, em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ($n=12$). O teor de PTOX no extrato foi determinado e o desvio padrão relativo (DPR%) calculado.

2.7.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada para PTOX empregando-se 3 soluções de referência, cada uma com seis concentrações distintas. O preparo e análise foram feitos em 3 dias consecutivos. Cada ponto das curvas foi obtido pela injeção, em triplicata, de diferentes alíquotas das soluções de referência, na faixa de 0,25 a 8 μL .

Os dados obtidos para cada curva de calibração foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (R^2) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos 3 dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de covariância ($p<0,05$) no *software* Graph Pad Prism 6.

2.7.2 Estimativas de faixas de concentração de trabalho

Estimativas das faixas de concentração de trabalho de PTOX foram estabelecidas com base nas áreas relativas do pico correspondente a PTOX de uma solução de referência com concentração de 1 mg mL^{-1} com àquelas de amostras analisadas de casa de vegetação e de cultivos *in vitro*.

2.7.3 Soluções estoque de referência (PTOX)

A partir do uso de balão volumétrico de 5 mL e em seguida de balão de 100 mL, completando-se para este volume final, diluindo-se aos poucos, foram preparadas 3 soluções de referência de PTOX. Podofilotoxina foi solubilizada em metanol, obtendo-se soluções de concentrações finais iguais a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (solução 1), 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (solução 2) e 13 $\mu\text{g mL}^{-1}$

(solução 3). Para a construção das curvas analíticas, diferentes volumes dessas soluções foram injetados no sistema de CLAE, conforme indicado na Tabela 5.

Tabela 5 - Correspondência entre volumes e as massas injetadas para a construção das curvas analíticas de podofilotoxina (PTOX).

Volume de injeção (μL)	Massa injetada (μg)
Soluções 1 e 2 de PTOX ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$)	
0,25	0,00625
1	0,025
2	0,05
4	0,1
6	0,15
8	0,2
Solução 3 de PTOX ($13 \mu\text{g mL}^{-1}$)	
0,5	0,0065
2	0,026
4	0,052
8	0,104
16	0,208

Fonte: Da autora (2020).

2.7.4 Exatidão

Os testes de recuperação foram realizados pela fortificação do extrato clorofórmico de *H. suaveolens* com quantidades conhecidas das substâncias de referência de PTOX. Esse parâmetro foi determinado a partir de três níveis de concentrações, considerados baixo, médio e alto, contemplando o intervalo linear do método analítico. Cada nível foi avaliado com três réplicas. Foram preparadas soluções metanólicas de PTOX, nas seguintes concentrações: $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TABELA 6). Para o preparo dessas soluções, partiu-se de uma solução mãe de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada pesando-se 5 mg e diluindo em balão volumétrico de 10 mL. Retirou-se 0,25 mL dessa solução e diluiu-se em balão de 10 mL ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), 0,30 mL da solução e diluiu-se em balão de 25 mL ($6 \mu\text{g mL}^{-1}$), 2,5 mL da solução de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e diluiu-se em balão de 10 mL ($1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Volumes das soluções, contendo massas conhecidas de PTOX, foram adicionados diretamente às raízes secas e pulverizadas de *H. suaveolens*, antes do início do processo de extração. Para o início da extração, esperou-se a secagem ao ar da solução adicionada. Após a fortificação, as amostras foram preparadas e analisadas. Amostras do extrato clorofórmico não fortificadas ($n=3$) também foram preparadas para a determinação da massa recuperada. A recuperação foi determinada empregando-se a seguinte equação: % Recuperação = massa experimental/massa teórica*100.

Tabela 6 - Correspondência entre os volumes e as massas das soluções de referência de PTOX adicionadas ao extrato clorofórmico de raízes de *H. suaveolens* na determinação da exatidão de PTOX.

Concentração da solução de PTOX ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nível	Volume de solução de PTOX adicionado às raízes (mL)	Volume de injeção (μL)	Massa de padrão adicionada às raízes (μg)
1,5	1	1	10	0,015
6,0	2	1	10	0,06
12,5	3	0,747	10	0,125

Fonte: Da autora (2020).

2.7.5 Robustez

A robustez foi avaliada por variações deliberadas nas condições de análise cromatográfica e por variações no volume de extrato clorofórmico tomado durante o preparo de amostra. Além da quantidade (ng) de PTOX avaliada para todos os parâmetros, a pureza espectral do pico correspondente a PTOX em todas as amostras também foi avaliada, seguindo-se as mesmas condições avaliadas para a seletividade (item 2.6.3).

Quanto às condições de análises, a robustez foi avaliada por alterações nos parâmetros cromatográficos: temperatura da coluna (24 e 26°C), fluxo (0,9 e 1,1 mL min⁻¹) e concentração de ácido fosfórico na fase móvel (0,09 e 0,11%). Para isso, três soluções extrativas foram preparadas (item 2.6.1) e analisadas empregando-se a condição estabelecida (item 2.6.2). Os parâmetros modificados na condição cromatográfica e preparo da amostra foram avaliados individualmente. As quantidades de PTOX mensuradas, a partir dessas amostras, foram submetidas à análise de variância ($p < 0,05$), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A alteração no procedimento de preparo da amostra foi analisada conforme a exatidão, seguindo determinações da RDC ANVISA 166 (BRASIL, 2017). A mudança efetuada no preparo das amostras foi no volume tomado da fração clorofórmica durante a obtenção das amostras (1 e 1,5 mL). Para isso, três soluções extrativas de raízes de *H. suaveolens* foram preparadas (item 2.6.1), a fim de avaliar a quantidade de PTOX nas amostras não fortificadas (quantidade nominal). Seguindo as mesmas condições para a avaliação da exatidão (item 2.7.4), massas conhecidas de PTOX em três níveis, considerados baixo, médio e alto, foram adicionadas às raízes pulverizadas de *H. suaveolens*, conforme descrito na Tabela 7. Cada nível foi avaliado com 3 réplicas. As soluções foram analisadas empregando-se a condição analítica estabelecida (item 2.6.2). Essa etapa foi realizada com 25 mg de raízes pulverizadas.

Tabela 7 - Condições empregadas para a avaliação da robustez quanto a alterações no volume da fração clorofórmica durante a preparação das amostras de raízes de *H. suaveolens* (cada nível, $n=3$).

Nível	Volume da fração clorofórmica ^a	Solução de PTOX ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume de solução de PTOX adicionado às raízes (mL)	Qtde de PTOX adicionada às raízes (μg)
Baixo	1	1,5	2,64	0,0396
Médio	1	6,0	1,41	0,0846
Alto	1	12,5	1,19	0,1496
Baixo	1,5	1,5	2,64	0,0396
Médio	1,5	6,0	1,41	0,0846
Alto	1,5	12,5	1,19	0,1496

Fonte: Da autora (2020).

^a Volume de trabalho da fração clorofórmica tomado durante a preparação da amostra (item 2.6.1).

2.7.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi inicialmente estimado a partir da equação que emprega os parâmetros da curva analítica:

$$LQ = 10 s/S$$

Onde: LQ = limite de quantificação; s: desvio padrão do intercepto da curva de regressão; S= inclinação da curva analítica.

A partir dos valores encontrados pela equação, o limite de quantificação foi determinado pela injeção, em quintuplicata, de massas decrescentes de PTOX (5,250 a 0,375 ng), obtidas por ajustes no volume de injeção (TABELA 8). O limite de quantificação foi determinado a partir da menor área dos picos que apresentaram precisão com DPR $\leq 3,0\%$.

Tabela 8 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas da solução de referência para determinação dos limites de quantificação e detecção de podofilotoxina.

Concentração da solução estoque ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume de injeção (μL)	Massa injetada (ng)
1,5	3,5	5,250
1,5	2,5	3,750
1,5	1	1,500
1,5	0,5	0,750
1,5	0,25	0,375

Fonte: Da autora (2020).

2.7.7 Limite de detecção

A estimativa do limite de detecção foi realizada a partir dos dados da curva analítica, utilizando-se a seguinte equação:

$$LD = 3,3 \text{ s/S}$$

Onde: LD = limite de detecção; s = desvio padrão do intercepto da curva de regressão; S=inclinação da curva analítica.

O limite de detecção também foi determinado pela injeção, em quintuplicata, de massas decrescentes de PTOX (5,250 a 0,375 ng), obtidas por ajustes no volume de injeção (TABELA 9). Foi estabelecido como a menor massa injetada detectável, que proporcionou altura do pico do analito com relação sinal-ruído (S/N) de 2 (BRASIL, 2017). Os valores de sinal-ruído (S/N) de cada pico foram gerados pelo *software* OpenLab Ezchrom®. Na Tabela 9, a seguir, está descrita a correspondência entre os volumes e as massas injetadas da solução de referência para determinação dos limites de quantificação e detecção de PTOX.

Tabela 9 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas da solução de referência para determinação dos limites de quantificação e detecção de podofilotoxina.

Concentração da solução estoque ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume de injeção (μL)	Massa injetada (ng)
1,5	3,5	5,250
1,5	2,5	3,750
1,5	1	1,500
1,5	0,5	0,750
1,5	0,25	0,375

Fonte: Da autora (2020).

2.8 Estabelecimento da espécie *in vitro*

O estabelecimento *in vitro* de *Hyptis suaveolens* foi realizado a partir da inoculação de sementes das plantas matrizes. Antes da assepsia, foi retirada a mucilagem das sementes, utilizando-se cal e água. Em seguida, foram imersas em hipoclorito de sódio 50% (hipoclorito/água) e mantidas sob agitação constante, durante 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar, foram lavadas cinco vezes com água destilada autoclavada e inoculadas. O meio de cultura para inoculação foi o MS com metade da concentração original de sais, 30g L^{-1} de sacarose, $5,5\text{ g L}^{-1}$ de ágar, com pH ajustado para $5,7\pm 0,1$. As plântulas obtidas foram as doadoras de raízes para a realização dos experimentos.

2.9 Cultivo *in vitro* de raízes de *H. suaveolens* em meio líquido com AIB e ANA

Plântulas de 45 dias após inoculação de sementes foram às doadoras de explantes para este experimento. Sob câmara de fluxo laminar e condições assépticas, raízes frescas destas plântulas foram pesadas (0,4 g) e inoculadas em meio de cultura líquido. O meio básico utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 30 g L^{-1} de sacarose, pH 5,7. Em Erlenmeyer de 125 mL foram utilizados 40 mL do meio. Os tratamentos foram: 1) controle: meio MS líquido sem regulador, 2) $0,5\text{ mg L}^{-1}$ de AIB+ $0,5\text{ mg L}^{-1}$ de ANA; 3) $0,5\text{ mg L}^{-1}$ de AIB+ 1 mg L^{-1} de ANA; 4) 1 mg L^{-1} de AIB + $0,5\text{ mg L}^{-1}$ ANA; 5) $0,5\text{ mg L}^{-1}$ AIB; 6) 1 mg L^{-1} de AIB; 7) $0,5\text{ mg L}^{-1}$ ANA; 8) 1 mg L^{-1} de ANA. Foram realizadas dez repetições (Erlenmeyer) por tratamento, em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

As raízes foram mantidas em *shaker* a 80 rpm, na ausência de luz. Avaliou-se esse experimento aos 42 dias. As variáveis analisadas foram: matéria fresca e seca das raízes iniciais e finais (tempo zero e aos 42 dias), índice de crescimento da matéria fresca e seca de raiz (ICMF = Matéria fresca raiz final (MFRF) - Matéria fresca raiz inicial (MFRI) / MFRI) e

(ICMS = Matéria seca raiz final (MSRF) - Matéria seca raiz inicial (MSRI) / MSRI); teor de PTOX nas raízes iniciais e finais; teor de PTOX presente no meio de cultura.

Para o cálculo de índices de crescimento de matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS), no dia da montagem do experimento, utilizando-se raízes do mesmo lote das raízes inoculadas nos tratamentos, foi pesado 0,4 g de raízes (essa foi a matéria fresca inicial das raízes) e estas foram secas para a obtenção da matéria seca inicial. Realizaram-se 30 repetições, escolheram-se 10 representativas. Obteve-se o valor de 11,69 mg para matéria seca inicial. Realizou-se a quantificação de PTOX inicial na matéria seca inicial. Para isso, foi preparado um *pool* de amostras de raízes com as 30 repetições e quantificou-se a PTOX em triplicata. Obteve-se 159,50 $\mu\text{g g}^{-1}$ de raiz.

2.10 Preparo das amostras para quantificação de PTOX

A avaliação de PTOX nas raízes foi realizada conforme método validado, descrito no item 2.6.1 (com 25 mg de raiz). Para a análise de PTOX no meio de cultura, primeiramente, realizou-se filtração simples do meio (em papel de filtro), coletando-se as raízes de cada uma das 10 repetições para pesagem e secagem em estufa, separadamente. O meio de cultura foi acondicionado em frascos de vidro e armazenado em freezer até a análise. O meio de cada frasco foi constituído pela união de 2 repetições de um único tratamento. Escolheram-se ao acaso 3 frascos de cada tratamento. O descongelamento dos meios destes frascos ocorreu à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após o descongelamento, coletou-se 1 mL do meio de cultura líquido de cada frasco; obtendo-se 3 repetições, e estas alíquotas foram acondicionadas em microtubos de 2 mL.

Após esse procedimento, adicionou-se ao microtubo 500 μL de clorofórmio; agitou-se por 1 minuto (vortex); centrifugou-se a 10.000 rpm por 5 minutos; recolheu-se a fase clorofórmica; aguardou-se a completa evaporação do clorofórmio sob capela de exaustão de gases; solubilizou-se o resíduo em 250 μL de metanol; agitou-se por 30 segundos (vortex); acondicionou-se em microvials e injetou-se diretamente no sistema de CLAE.

2.11 Cultivo *in vitro* de raízes de *H. suaveolens* em meio líquido com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol

Raízes de plântulas de 46 dias foram utilizadas como explantes. O meio de cultura líquido (40 mL) utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg

L^{-1} AIB, $0,5 \text{ mg } L^{-1}$ de ANA e $30 \text{ g } L^{-1}$ de sacarose, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Realizaram-se 4 tratamentos: T1) MS sem vitaminas e sem mio-inositol; T2) MS com $\frac{1}{2}$ das vitaminas e $\frac{1}{2}$ do mio-inositol; T3) MS com a concentração original de vitaminas e mio-inositol; T4) MS com o dobro de vitaminas e o dobro de mio-inositol, cada tratamento foi constituído de 10 repetições. O experimento foi avaliado aos 44 dias empregando-se os parâmetros matéria fresca (MFR) e seca (MSR) de raízes.

2.12 Análises estatísticas

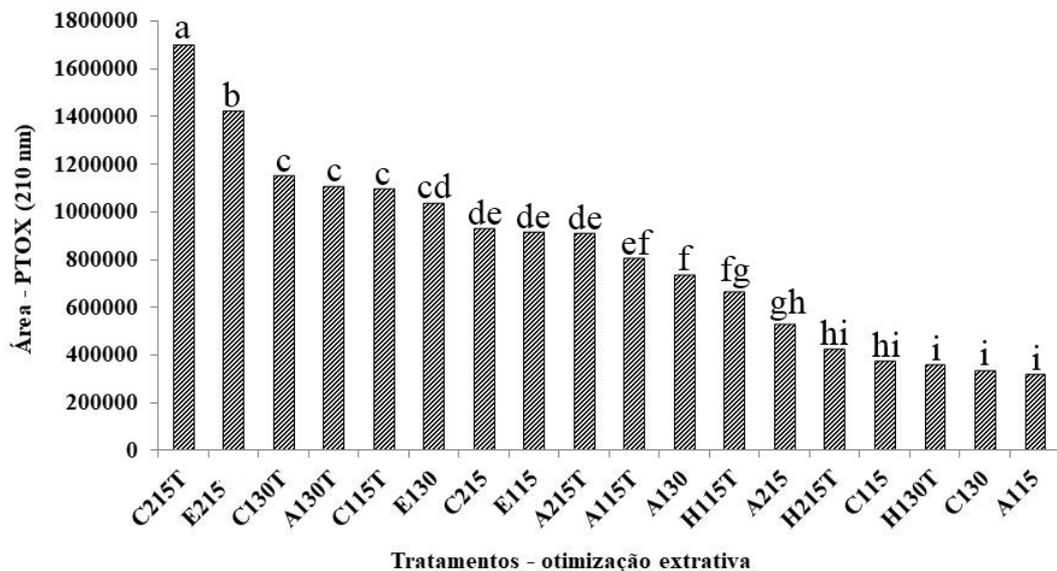
Os dados da otimização extrativa e de cultura de tecidos foram analisados por análise de variância simples (ANOVA) e testes de Tukey e Scott knott, respectivamente. Diferenças entre os grupos avaliados foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas da validação do método foram feitas nos programas Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation, 2003), GraphPad Prism[®] versão 6.0 (Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA) e no *software* R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização extrativa

O tratamento que possibilitou maior eficiência extrativa para PTOX foi o que realizou 2 ciclos de sonicação por 15 minutos, empregando em cada ciclo 900 μ L de tampão fosfato de potássio pH=7 (25 mM) + 600 μ L de clorofórmio (C215T) ($p < 0,05$) (FIGURA 2).

Figura 2 - Áreas (210 nm) e tratamentos analisados na otimização extrativa. Legenda: (C= clorofórmio, E= etanol, A=acetato de etila, H=hidroalcoólico); número de ciclos (1 ou 2); tempo de sonicação (15 minutos ou 30 minutos); T= presença de tampão fosfato de potássio pH 7. As colunas que apresentam a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



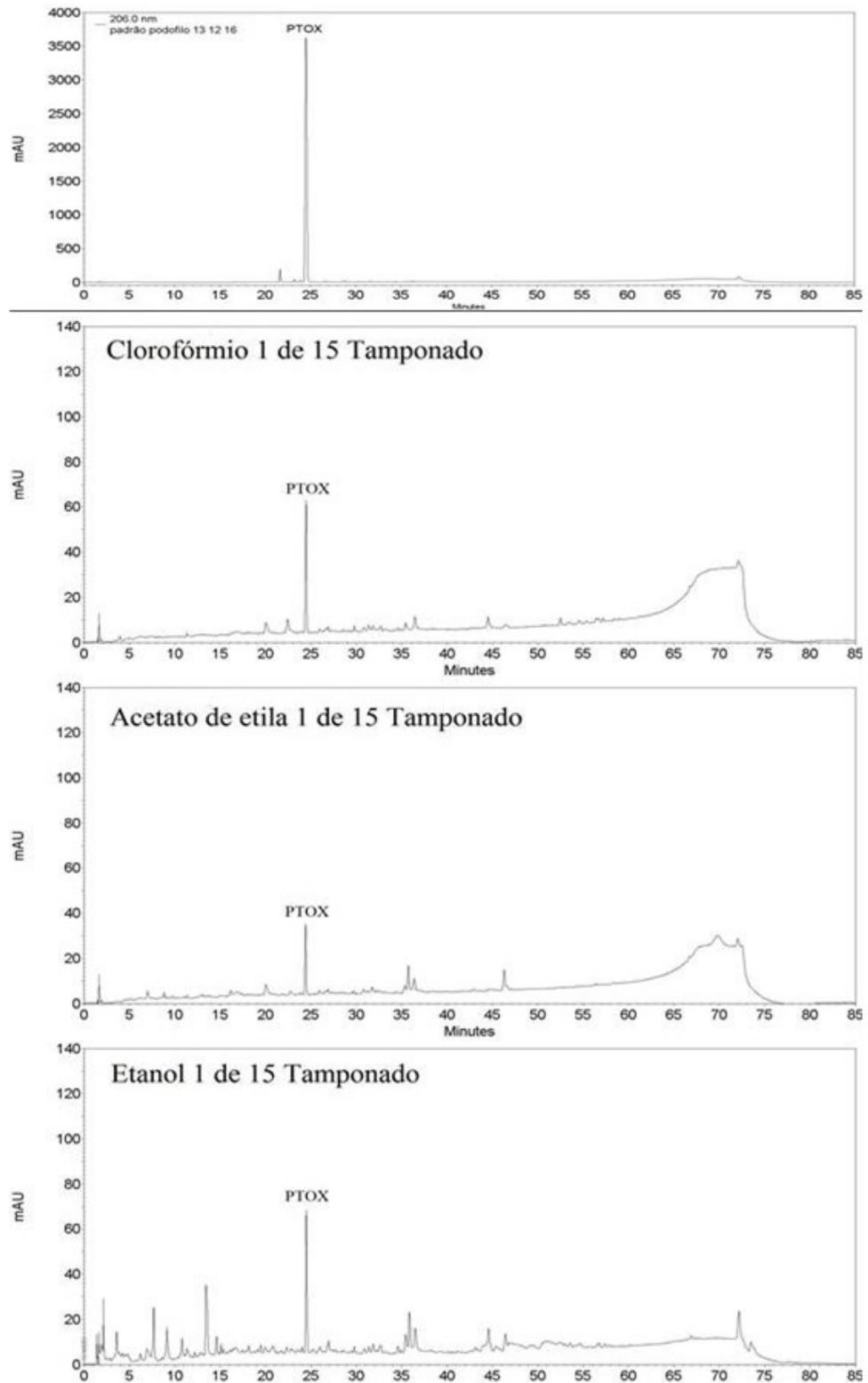
Fonte: Da autora (2020).

Nota-se que a presença do tampão na extração com clorofórmio aumentou substancialmente a área relativa do pico correspondente a PTOX. De acordo com Canel *et al.* (2001), a reidratação dos tecidos em pó de *Podophyllum peltatum* L, antes da extração com um solvente orgânico, permitiu que a β -glicosidase endógena hidrolisasse o 4-O- β -glicosídeo de lignana *in situ* aumentando o rendimento de PTOX. Assim, no presente trabalho, a hidratação das raízes de *H. suaveolens* com tampão de fosfato de potássio pH 7, antes da extração com solvente (clorofórmio e acetato de etila), pode ter aumentado o rendimento de PTOX pelas mesmas razões.

Entretanto, ocorreu o inverso nos tratamentos que utilizaram o etanol tamponado (FIGURA 2). No caso dos extratos etanólicos, também foi observada uma desvantagem do ponto de vista analítico para essas amostras. As amostras preparadas com etanol apresentaram perfis cromatográficos altamente complexo, com detecção de interferentes no pico correspondente a PTOX. As Figuras 3 a 8 apresentam os perfis cromatográficos representativos de cada amostra.

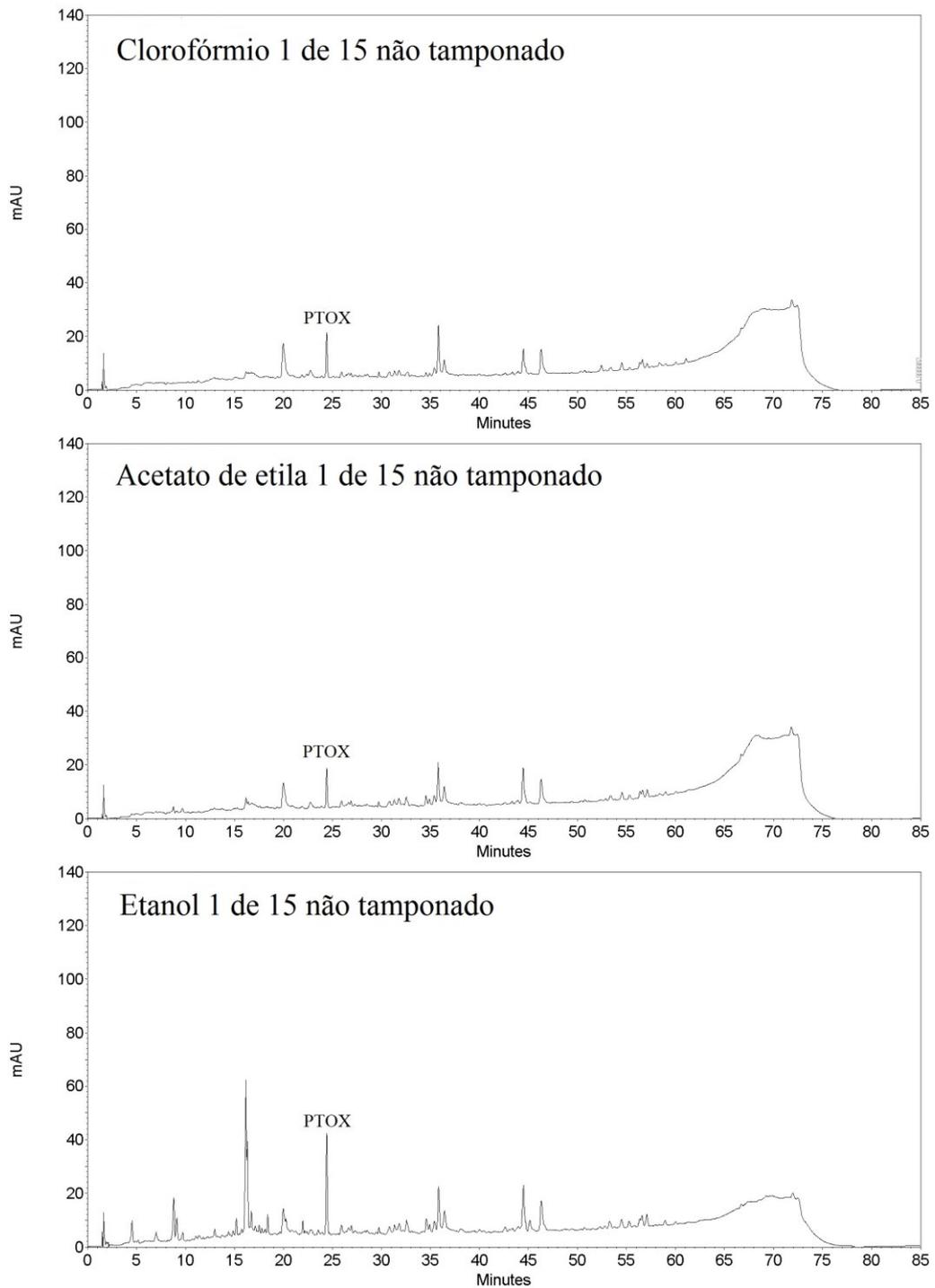
Em relação ao número de ciclos de extração e o tempo de cada um, foram obtidos resultados que não seguiram resultado típico. Estão incluídas nesse fator variáveis não controladas, como volatilização do solvente, degradação da substância após um período de sonicação, dentre outros fatores.

Figura 3 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD para PTOX de referência e extração com clorofórmio, acetato de etila e etanol tamponados, empregando 1 ciclo de sonicação por 15 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.



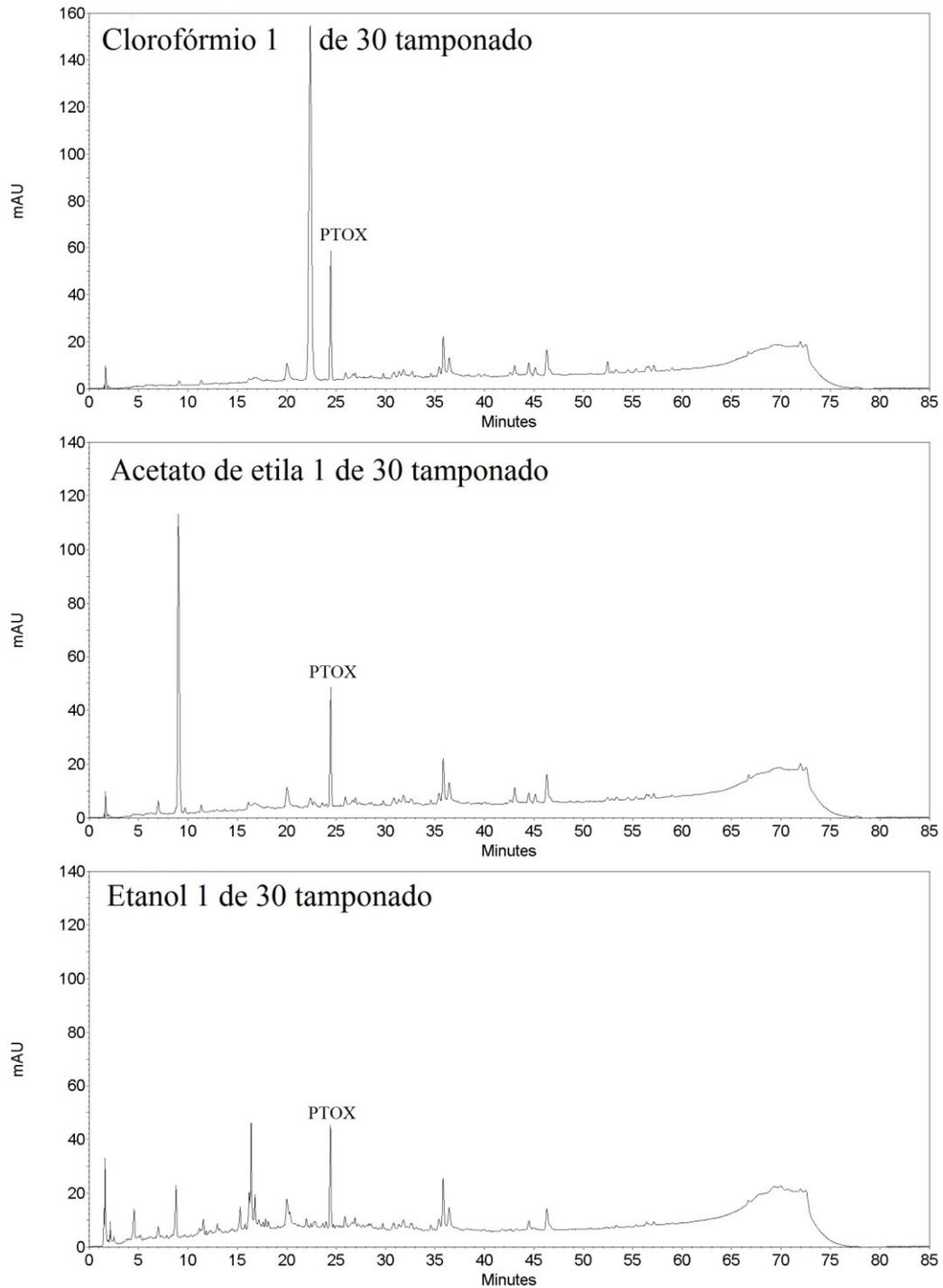
Fonte: Da autora (2020).

Figura 4 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD de extratos de raízes de *H. suaveolens* obtidos com clorofórmio, acetato de etila e etanol não tamponados, empregando 1 ciclo de sonicação por 15 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.



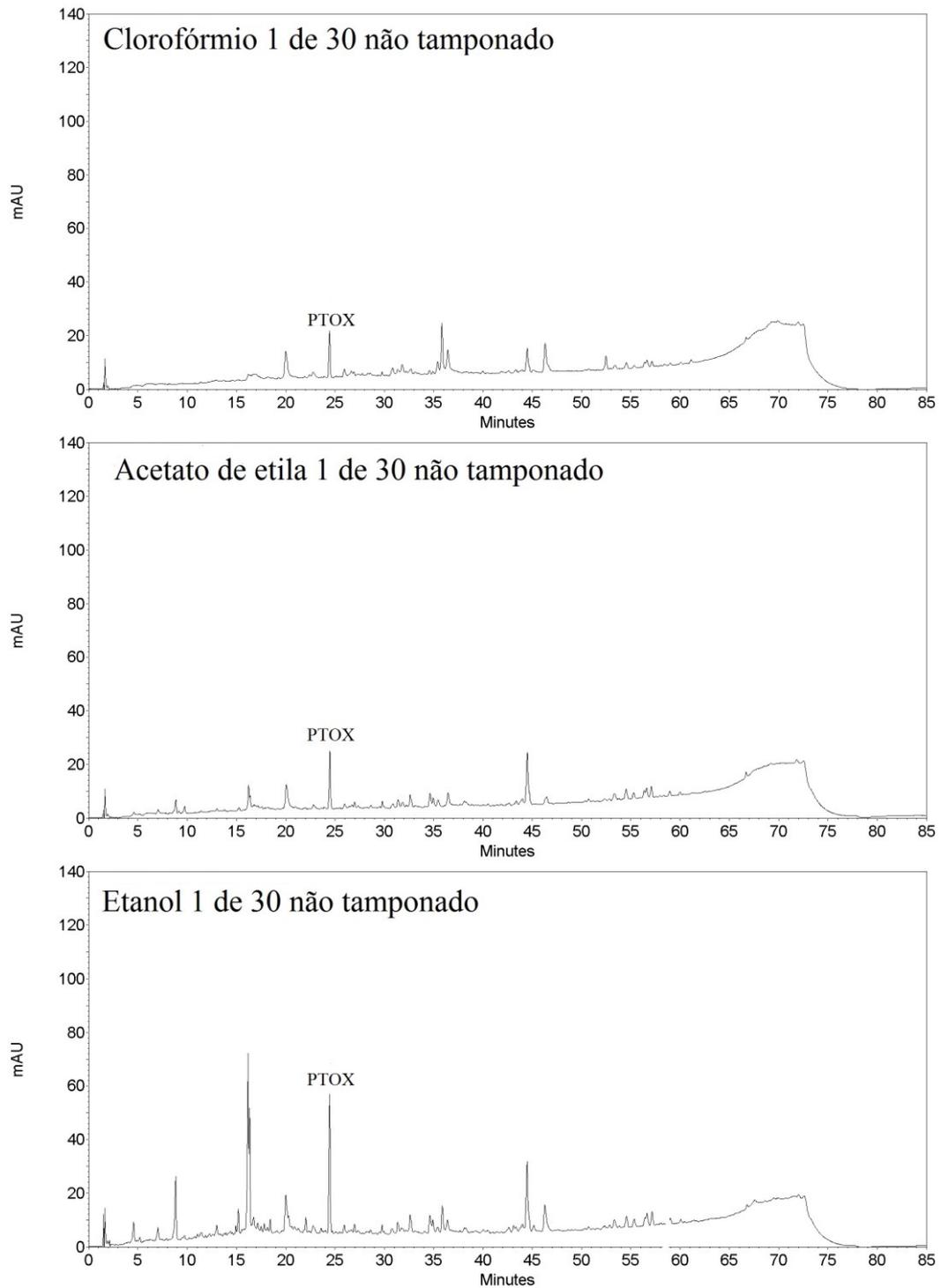
Fonte: Da autora (2020).

Figura 5 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD de extratos de raízes de *H. suaveolens* obtidos com clorofórmio, acetato de etila e etanol tamponados, empregando 1 ciclo de sonicação por 30 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.



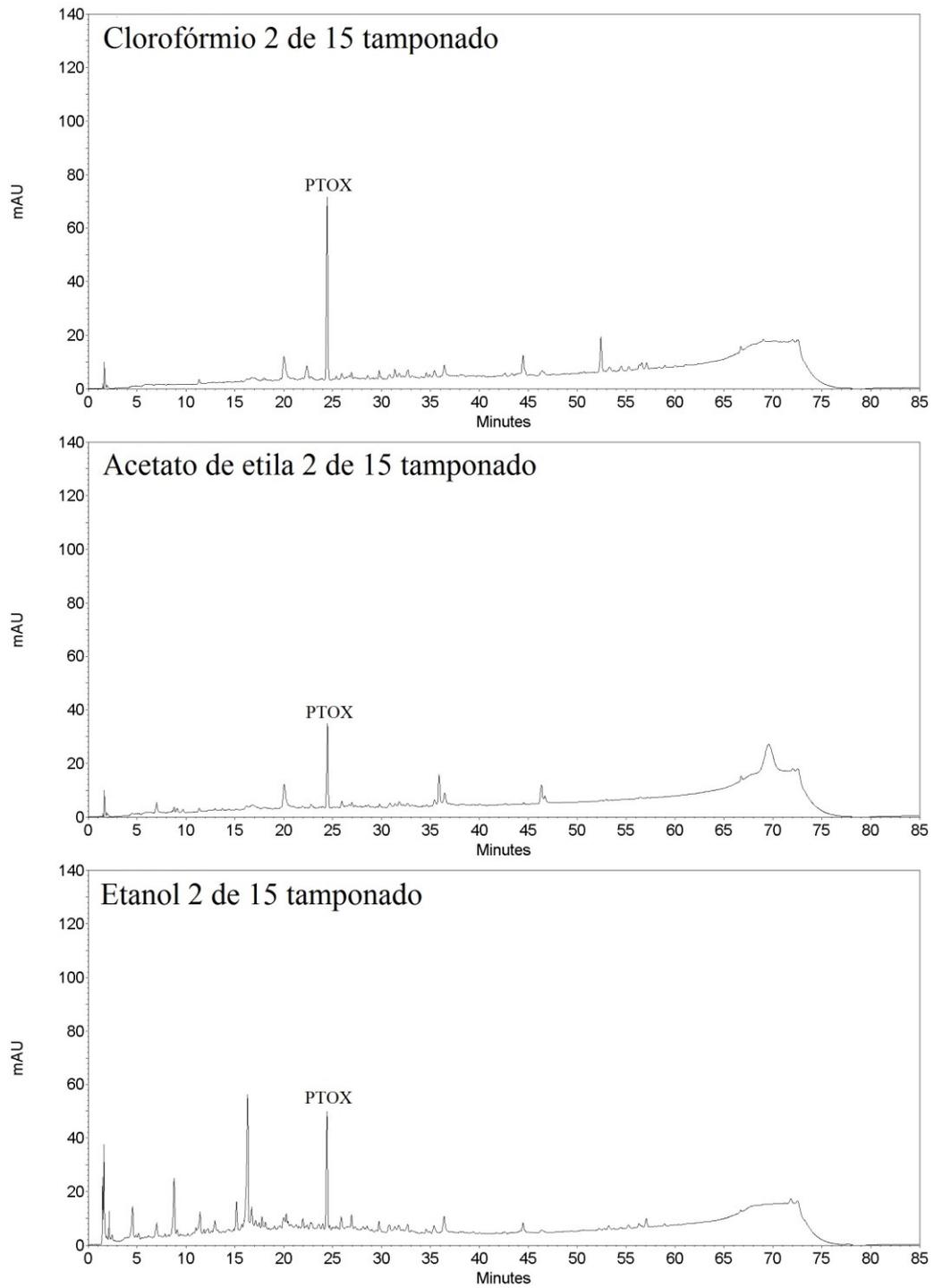
Fonte: Da autora (2020).

Figura 6 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD de extratos de raízes de *H. suaveolens* obtidos com clorofórmio, acetato de etila e etanol não tamponados, empregando 1 ciclo de sonicação por 30 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.



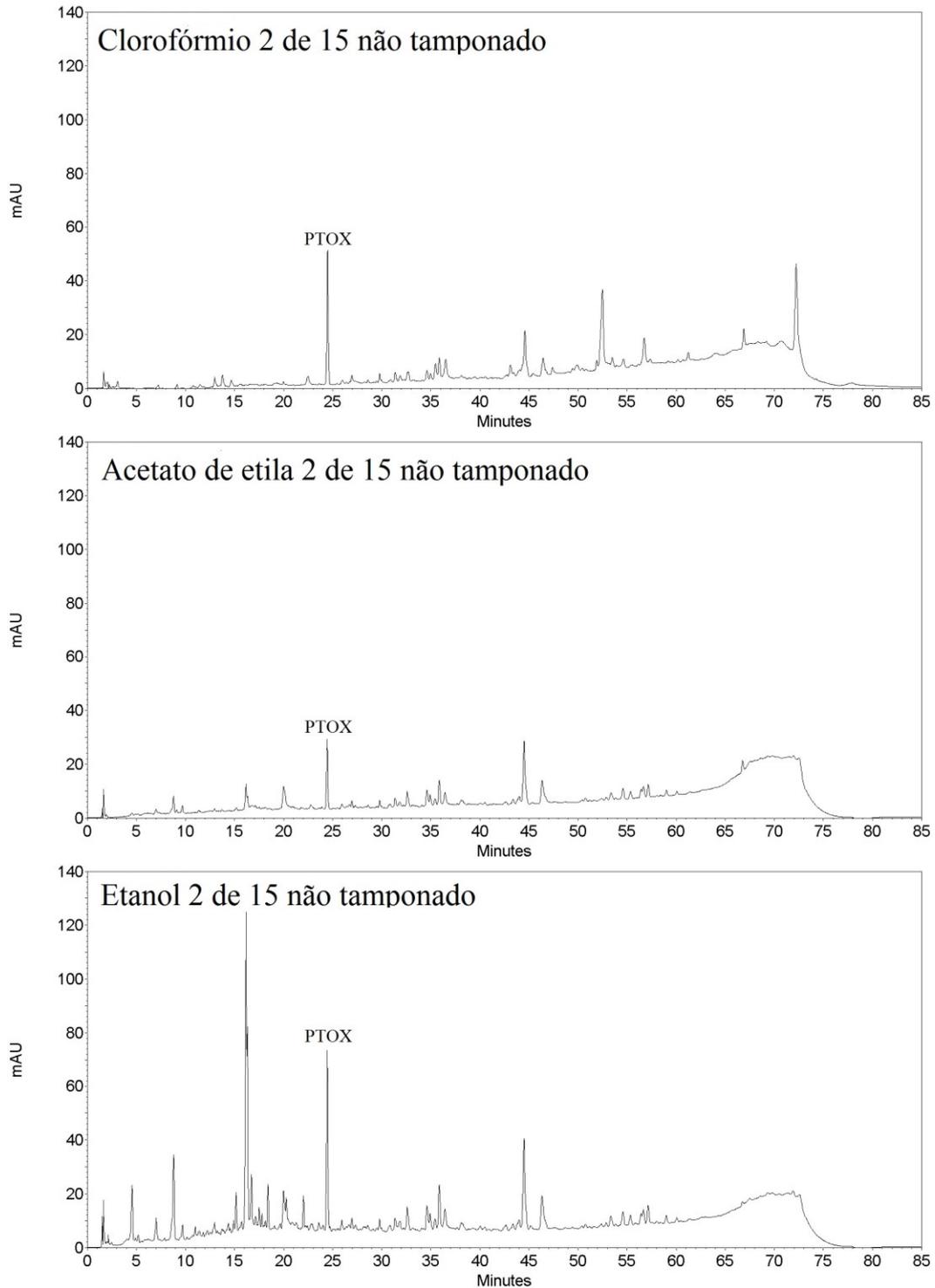
Fonte: Da autora (2020).

Figura 7 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD de extratos de raízes de *H. suaveolens* obtidos com clorofórmio, acetato de etila e etanol tamponados, empregando 2 ciclos de sonicação por 15 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.



Fonte: Da autora (2020).

Figura 8 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD de extratos de raízes de *H. suaveolens* obtidos com clorofórmio, acetato de etila e etanol não tamponados, empregando 2 ciclos de sonicação por 15 minutos. Condições cromatográficas: vide item 2.4.2.



Fonte: Da autora (2020).

3.2 Estabilidade do analito após o preparo da amostra

A estabilidade química de PTOX nas amostras foi avaliada mantendo-se as soluções no carrossel do cromatógrafo, à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), as quais foram analisadas sequencialmente nos intervalos de 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 e 42 horas.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as áreas médias ($n=6$) dos picos correspondentes a PTOX dentro dos períodos ensaiados ($p<0,05$) (TABELA 10). Desse modo, as amostras podem ser mantidas no carrossel do cromatógrafo, até 42 horas após o preparo, sem acarretar alterações nos resultados.

Tabela 10 - Área relativa média ($n=6$) do pico correspondente a PTOX durante a avaliação da estabilidade química, a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), por até 42 h das amostras preparadas a partir de raízes de *H. suaveolens*.

Tempo (horas)	Área relativa média do pico correspondente a PTOX
0	1427813 a
6	1453724 a
12	1456218 a
18	1465440 a
24	1412606 a
30	1466314 a
36	1427629 a
42	1423983 a

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste F, ao nível de 5% de probabilidade.

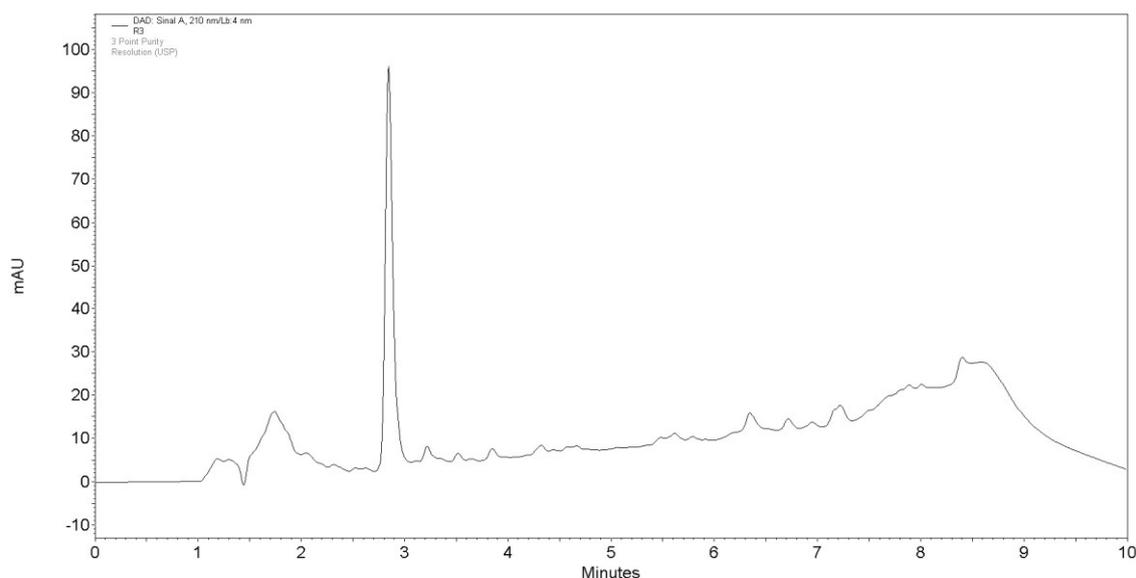
3.3 Desenvolvimento da condição cromatográfica

O desenvolvimento da condição cromatográfica para a quantificação de PTOX partiu da análise do perfil exploratório obtido de amostras de raízes de casa de vegetação de *H. suaveolens*. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 2.6.1. A fim de garantir menor tempo de análise possível, seletividade e resolução adequada de PTOX com picos vizinhos ($R_s > 1,5$) foram realizadas alterações nas proporções do modificador orgânico, temperatura, fluxo, modo de eluição (isocrático e gradiente linear) e inclinação do gradiente.

A condição experimental G (TABELA 3, item 2.5.5) foi a que resultou em menor tempo de análise (10 minutos), menor flutuação de linha de base, seletividade e resolução

maior que 1,5 para a quantificação do pico correspondente a PTOX, e foi definida como a condição estabelecida. A Figura 9 mostra o perfil cromatográfico da amostra de *H. suaveolens* analisada nessa condição.

Figura 9 - Perfil cromatográfico por CLAE-DAD representativo de extratos de raízes de *H. suaveolens* obtidos para a condição cromatográfica estabelecida. Condições de preparo de amostra e cromatográficas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.



Fonte: Da autora (2020).

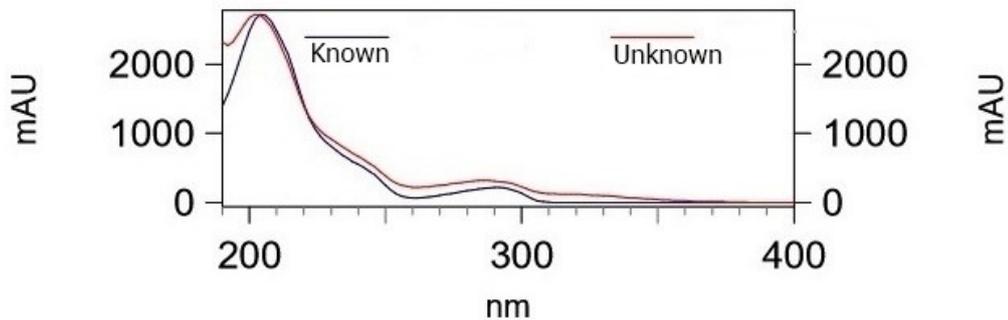
3.4 Validação do método analítico

3.4.1 Seletividade

A condição cromatográfica estabelecida (item 2.6.2) foi seletiva para o pico correspondente a PTOX. A seletividade foi demonstrada pela homogeneidade espectral do pico da PTOX, por meio de cálculos matemáticos executados pelo *software* EZChrom[®] para pureza de pico, empregando 3 pontos. O valor de similaridade obtido foi de 99% para todas as amostras avaliadas ($n=6$).

Avaliou-se, também, a sobreposição espectral do pico em TR=2,73 min da amostra de *H. suaveolens* (*unknown*) com o pico de PTOX de referência (*known*) (FIGURA 10). A similaridade espectral observada entre os dois picos foi de 99%. Devido à seletividade do método, pode-se afirmar que as determinações quantitativas de PTOX não estarão sujeitas a interferências de outros componentes da matriz.

Figura 10 - Sobreposição espectral do pico em TR=2,73 min da amostra de *H. suaveolens* (*unknown*) com o pico de PTOX de referência (*known*) a 210 nm.



Fonte: Da autora (2020).

3.4.2 Teste de adequabilidade do sistema

A confiabilidade da condição cromatográfica estabelecida foi examinada por teste de adequabilidade do sistema, compreendendo a avaliação da pureza do pico (P), resolução (R_s), fator de assimetria (A_s), número de pratos teóricos (N), fator de retenção (k) e repetibilidade, avaliada pelo DPR do tempo de retenção, para o pico de interesse ($n=6$).

Os resultados foram expressos como valor médio de seis determinações e estão apresentados na Tabela 11, junto aos limites recomendados por Epshtein (2020). Observa-se que, com exceção para o fator de retenção (k), todos parâmetros estão dentro dos limites indicados pelo Epshtein (2020). O fator de retenção é a medida da capacidade da coluna em reter um componente da amostra, ou seja, é a medida de retenção na fase estacionária (SADEK, 2000). O valor de $k=1,23$ não constitui um problema, pois apenas indica uma eluição relativamente precoce do pico de interesse analítico. Desse modo, o fator de retenção (k) não é um parâmetro comprometedor para análises quantitativas.

Testes de adequabilidade do sistema são diretamente afetados pela repetibilidade da retenção da amostra. Variações na retenção dos picos em diferentes corridas indicam ausência de reprodutibilidade do sistema. Observou-se que o sistema cromatográfico é adequado para a análise de PTOX por CLAE em raízes de *H. suaveolens*.

Tabela 11 - Parâmetros da adequabilidade do sistema, valores médios obtidos e valores recomendados por Epshtein (2020).

Parâmetros de adequabilidade do sistema	Média ($n=6$)	Valores recomendados Epshtein (2020)
Pureza de 3 pontos (P)	0,99	-
Resolução (R_s) (USP)	2,92	$\geq 1,5$
Número de pratos teóricos (N) (USP)	7064	≥ 2000
Fator de retenção (k)	1,23*	> 2
Fator de assimetria (A_s)	1,31	$0,8 \geq 1,5$
DPR do tempo de retenção (%)	0,61%	$\leq 2\%$ para $n \geq 5$

Fonte: Da autora (2020).

*O fator de retenção está abaixo do recomendado, devido ao baixo tempo de retenção do analito, porém visto que um tempo de retenção menor ocasiona economia de tempo e dinheiro, está adequado.

3.4.3 Precisão

A repetibilidade foi avaliada por meio de seis determinações de PTOX no extrato. Já a precisão intermediária foi avaliada por meio de doze determinações. Os desvios padrões relativos (DPR) foram calculados. Na Tabela 12, estão apresentados os valores de repetibilidade obtidos.

Tabela 12 - Área relativa do pico correspondente a PTOX e desvio padrão relativo observados na determinação da repetibilidade de amostras de *H. suaveolens* na condição cromatográfica estabelecida. Condições de preparo de amostra e cromatográficas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.

Amostras*	Área relativa do pico correspondente a PTOX
1	1076237
2	1090001
3	1110710
4	1075560
5	1141550
6	1075823
Área média (210 nm)	1094980,17
Desvio padrão	26595
DPR (%)	2,43

Fonte: Da autora (2020).

*Condições de preparo de amostra e cromatográficas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.

Os valores obtidos para a precisão intermediária estão apresentados na Tabela 13. As áreas dos dois dias consecutivos (n=12) apresentaram desvio padrão relativo adequado (2,96%). O método avaliado apresentou precisão intradia e interdia adequadas, visto que o valor de DPR observado nesses ensaios foram inferiores a 5,00%, conforme critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 13 - Área relativa do pico correspondente a PTOX e desvio padrão relativo observados na determinação da precisão intermediária de amostras de *H. suaveolens* na condição cromatográfica estabelecida. Condições de preparo de amostra e cromatográficas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.

Dia	Amostras*	Área relativa do pico correspondente a PTOX
1	1	1076237
1	2	1090001
1	3	1110710
1	4	1075560
1	5	1141550
1	6	1075823
2	7	1123053
2	8	1083116
2	9	1025416
2	10	1050665
2	11	1090539
2	12	1030335
-	Área média	1085697
-	Desvio padrão	32156
-	DPR (%)	2,96

Fonte: Da autora (2020).

*Condições de preparo de amostra e cromatográficas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.

3.4.4 Linearidade

Para a construção da curva analítica de PTOX, visando avaliar a linearidade do método, fez-se necessário estimar inicialmente a faixa de concentração dessa substância nas raízes de *Hyptis suaveolens*. As estimativas foram baseadas nas áreas relativas do pico correspondente a PTOX de uma solução de referência com concentração de 1 mg/mL com àquelas de amostras analisadas de casa de vegetação e de cultivos *in vitro*. Com base nos valores obtidos, foram calculadas as massas estimadas de PTOX, para definição da faixa de

trabalho de 80 a 120% da massa nominal, segundo critérios da RDC ANVISA 166/2017 (BRASIL, 2017). A faixa de trabalho representada pelos valores de massa injetada e suas respectivas áreas e desvio padrão relativo, obtidas para as 3 curvas analíticas, em 3 dias consecutivos estão apresentadas na Tabela 14.

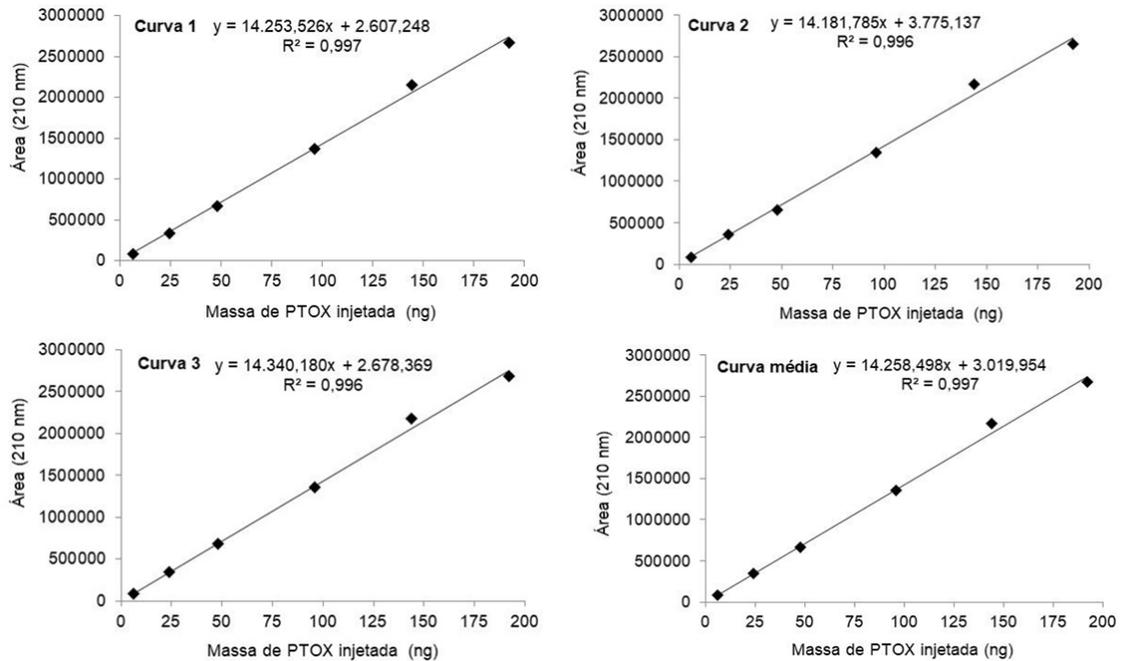
Tabela 14 - Massa injetada, áreas médias ($n=3$) e desvio padrão relativo dos pontos das curvas analíticas, obtidas nos 3 dias de análise. Condições cromatográficas vide item 2.6.2.

Vol. inj. (µL) curvas 1 e 2	Vol. inj. (µL) curva 3	Massa inj. (ng)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
			Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)
			Solução de referência (25 µg mL ⁻¹)				Solução de referência (13 µg mL ⁻¹)	
0,25	0,5	6	84441	1,72	83996	0,58	83465	2,47
1	2	24	335229	1,27	348726	1,25	348696	0,02
2	4	48	668456	2,15	656774	0,72	678501	4,13
4	8	96	1373065	3,35	1341898	1,16	1361134	2,21
6	12	144	2151182	2,00	2167906	1,00	2184629	0,77
8	16	192	2671979	0,94	2653005	1,67	2681471	3,29

Fonte: Da autora (2020).

Os dados da análise de regressão linear, dos três dias de análises; as três curvas analíticas individuais e a curva média das três curvas obtidas para PTOX estão apresentados na Figura 11 e na Tabela 15.

Figura 11 - Curvas analíticas e média das curvas obtidas por CLAE-FR, em três dias consecutivos para PTOX.



Fonte: Da autora (2020).

Tabela 15 - Dados de regressão linear para as curvas analíticas de PTOX, em três dias consecutivos de análise.

Parâmetros estatísticos	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Faixa linear (ng)		6 a 192	
Coefficiente de determinação	0,997	0,996	0,996
Inclinação	14254	14182	14340
Erro padrão da inclinação	366,7	453,4	433,1
Valor P - inclinações das 3 curvas		0,9650	
Intercepto	2607	3775	2678
Erro padrão do intercepto	39534	48881	46687
Valor P - interceptos das 3 curvas		0,9438	

Fonte: Da autora (2020).

Valor P >0,05 = indica diferença estatisticamente não significativa.

De acordo com o resultado da análise do *software* GraphPad Prism, pode-se concluir que as diferenças entre as inclinações são não significativas. Como as inclinações não são significativamente diferentes é possível calcular uma inclinação para todos os dados. A inclinação agrupada é igual a 14258, conforme a equação da curva média (FIGURA 11).

Pode-se concluir, além disso, que as diferenças entre os interceptos não são significativas. Como os interceptos do eixo Y não são significativamente diferentes é possível

calcular um intercepto em Y para todos os dados. A interceptação agrupada é igual a 3020, conforme a equação da curva média apresentada na Figura 11.

3.4.5 Limites de quantificação e detecção

Inicialmente, os limites de quantificação e detecção foram determinados a partir de parâmetros da equação das curvas analíticas. Para os cálculos, foram utilizados o desvio padrão do intercepto e a inclinação das curvas analíticas obtidas. Obteve-se o limite médio de quantificação de 0,58 ng e de detecção de 0,19 ng (TABELA 16).

Tabela 16 - Limites de quantificação e detecção determinados com base nos parâmetros das curvas analíticas obtidas. Condições cromatográficas vide item 4.2.

Parâmetro da curva	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média
Intercepto com o eixo y	2607,25	3775,14	2678,37	3020,25
Desvio padrão do intercepto (entre as 3 curvas)		825,82		
Inclinação	14254	14182	14340	14258,67
Limite de quantificação (ng)	0,58	0,58	0,58	0,58
Limite de detecção (ng)	0,19	0,19	0,19	0,19

Fonte: Da autora (2020).

Em seguida, a partir dos valores encontrados pela equação, os limites de quantificação e detecção foram determinados pela injeção em quintuplicata, de massas decrescentes obtidas por ajustes no volume de injeção de uma solução de referência de PTOX na concentração de $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na Tabela 17, estão apresentados as áreas médias e os desvios padrão relativos determinados. O limite de quantificação foi determinado como a menor massa injetada que apresentou resultados com precisão adequada ($\text{DPR} < 3\%$).

Tabela 17 - Limites de quantificação e detecção determinados experimentalmente. Condições cromatográficas vide item 2.6.2.

Volume de injeção solução de PTOX (μL)	Massa injetada (ng)	Área média (n=5)	DPR (%)	Relação S/N (USP)	LQ* e LD** Experimentais
3,5	5,25	115501	1,55	10,269	
2,5	3,75	78789	7,74	12,468	LQ \geq 5,25 ng
1,0	1,5	30306	10,02	6,80	
0,5	0,75	15583	14,67	2,475	LD \geq 0,5 ng
0,25	0,375	7179	15,84	1,977	

Fonte: Da autora (2020).

* Limite de quantificação (LQ) segue critérios da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000), $\text{DPR} \leq 5\%$. ** Limite de detecção (LD) segue critérios RDC 166/2017 (BRASIL, 2017), relação $\text{S/N} \geq 2:1$.

Comparando os resultados obtidos pelos parâmetros da curva analítica (LQ= 0,58 ng e LD= 0,19 ng) e experimentalmente (LQ= 5,25 ng e LD= 0,5 ng), observa-se que os valores são distintos. Recomenda-se seguir os valores experimentais.

3.4.6 Exatidão

Os testes de recuperação foram realizados pela fortificação das raízes pulverizadas de *H. suaveolens* com quantidades conhecidas de PTOX de referência, em três níveis de concentração e em triplicata para cada nível. Para tanto, foram preparadas soluções metanólicas de PTOX (12,5; 6,0 e 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Volumes diferentes das soluções, contendo massas conhecidas das substâncias, foram adicionados diretamente a 50 mg das raízes pulverizadas de *H. suaveolens*, conforme discriminado na Tabela 18.

Após a fortificação, soluções foram preparadas e analisadas como descrito nos itens 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente. Amostras de raízes de *H. suaveolens* não fortificadas ($n = 3$) também foram preparadas para a determinação da massa recuperada.

A recuperação foi determinada empregando-se a equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \text{massa experimental} \times 100 / \text{massa teórica}$$

Na Tabela 18, estão apresentados resultados do ensaio de recuperação para PTOX. A recuperação média de PTOX no nível 1 foi de 90,47%; no nível 2 = 98,03%; e no nível 3 = 101,85%. Segundo Green (1996) e Snyder *et al.* (1997), os valores de recuperação devem

estar entre 98-102% e 99-101%, respectivamente. No entanto, a AOAC estabelece faixas de recuperação em função da concentração do analito na amostra em estudo (AOAC, 2000). Para analitos com concentrações de 0,1%, 0,01% preconiza-se taxas de recuperação de 90-108% e 85-110%, respectivamente. Portanto, pode-se constatar que os valores de recuperação obtidos para estas substâncias atendem os limites estabelecidos pelas literaturas.

Os cromatogramas obtidos para as amostras controle, nível 1 (mínimo), nível 2 (médio) e nível 3 (máximo) estão apresentados na Figura 12.

Tabela 18 - Valores de recuperação de PTOX (média, n=3).

Nível	Solução de PTOX ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume (mL) da solução de PTOX adicionada às raízes	Massa teórica de PTOX adicionada (ng)	Massa de PTOX da amostra controle ^a (ng)	Massa teórica de PTOX na amostra fortificada ^b (ng)	Massa experimental de PTOX na amostra fortificada ^c (ng)	Recuperação de PTOX ^d (%)	DPR (%)
1	1,5	1	15,00	33,32	48,32	43,71	90,47	4,46
2	6	1	60,00	33,32	93,32	91,48	98,03	4,46
3	12,5	1	93,40	75,93	169,33	172,47	101,85	4,78

Fonte: Da autora (2020).

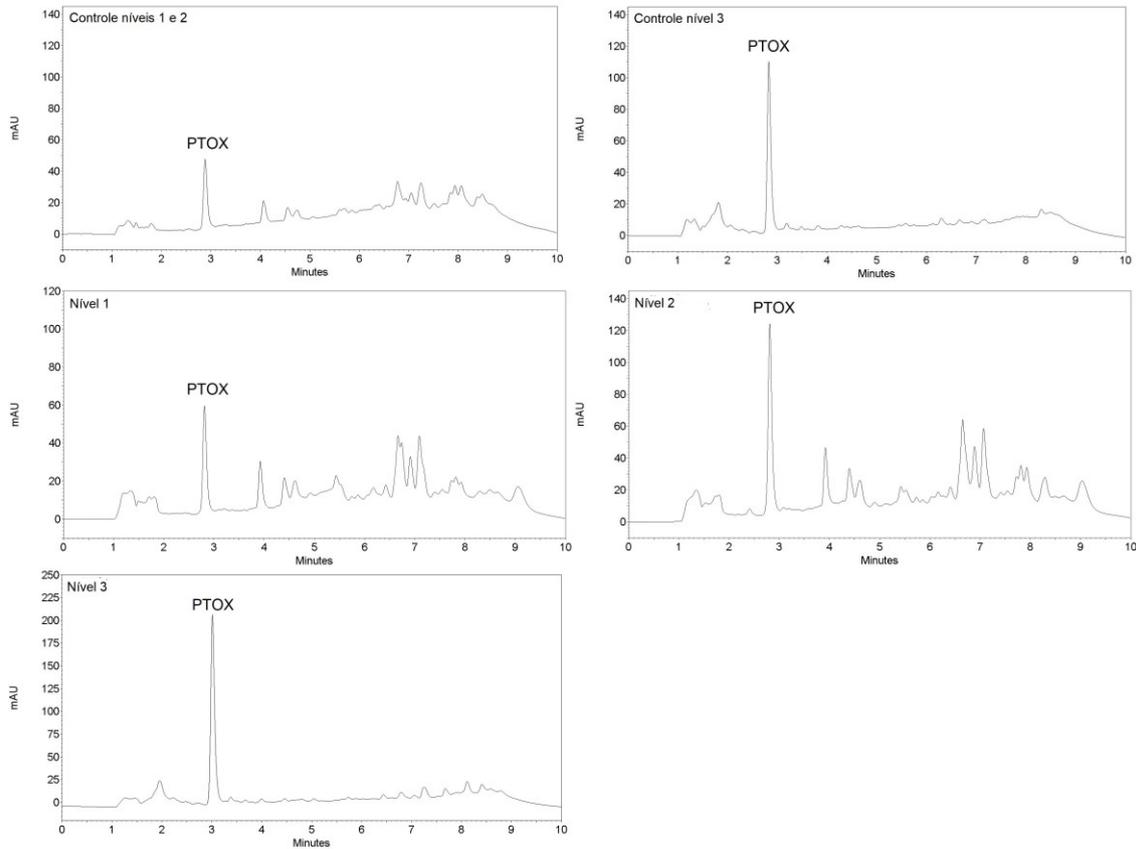
^a Quantidade (ng) de PTOX na amostra não fortificada.

^b Quantidade (ng) de PTOX na amostra não fortificada + Quantidade (ng) de PTOX adicionada = Quantidade teórica de PTOX.

^c Quantidade (ng) de PTOX determinada experimentalmente nas amostras fortificadas.

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

Figura 12 - Cromatogramas representativos obtidos por CLAE-DAD na etapa de exatidão para amostra controle (sem adição de padrão) e amostras com adição de padrão (níveis mínimo, médio e máximo) de *H. suaveolens* obtidos para a condição cromatográfica estabelecida. Condições de preparo de amostra e cromatográficas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.



Fonte: Da autora (2020).

3.4.7 Robustez

Em relação às mudanças nos parâmetros cromatográficos, após a análise de variância, observou-se que as alterações no método não resultaram em diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) em relação à condição nominal, assegurando a robustez do método frente a pequenas variações nas condições analíticas estabelecidas, sem comprometer a confiabilidade dos resultados (TABELA 19).

Tabela 19 - Massas de PTOX obtidas durante a avaliação da robustez de amostras de *H. suaveolens* frente a variações deliberadas na condição cromatográfica estabelecida. Condições de preparo de amostra e cromatográfica estabelecida vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.

Condição cromatográfica	Massa de PTOX (ng)
Temperatura da coluna a 26°C	81,73 a
0,09 % de ácido fosfórico	81,62 a
0,11% de ácido fosfórico	81,48 a
Fluxo de 0,9 mL min ⁻¹	81,03 a
Fluxo de 1,1 mL min ⁻¹	80,11 a
Temperatura da coluna 24°C	79,91 a
Nominal	79,91 a

Fonte: Da autora (2020).

Entretanto, a mudança no preparo da amostra, ou seja, no volume de clorofórmio pipetado (1 e 1,5 mL) acarretou diferenças estatisticamente significativas, indicando que esse parâmetro deve ser rigorosamente respeitado Tabelas 20 e 21. Ressalta-se também que a variação na especificação do clorofórmio, conforme informado no item 2.6.1 causa variações substanciais no método. Portanto, esse método está validado para clorofórmio estabilizado com amileno.

Tabela 20 - Massas de PTOX obtidas durante a avaliação da robustez de amostras de *H. suaveolens* frente a variações no volume de extrato clorofórmico pipetado durante o procedimento de preparo de amostra. Condições de preparo de amostra e cromatográfica estabelecidas vide item 2.6.1 e 2.6.2, respectivamente.

Volume de extrato clorofórmico pipetado (mL)	Níveis	Massa de PTOX (ng)
1,5	3	184,62
1	3	136,99b
1,5	2	125,22b
1,5	1	90,80c
1	2	89,45c
1	1	61,11d

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21 - Valores de recuperação de PTOX nas amostras de raízes de *H. suaveolens* durante a avaliação da robustez quanto a alterações no volume do extrato clorofórmico durante a preparação das amostras (média, $n=3$).

Nível	Volume extrato ^a (mL)	Amostra não fortificada ^b	Qtde de PTOX adicionada (ng)	Qtde teórica de PTOX (ng) ^c	Qtde experimental de PTOX (ng) ^d	Recuperação de PTOX ^e (%)	DPR (%)
1	1	20,05	39,59	59,64	61	102,28	0,54
2	1	20,05	84,59	104,64	89,45	85,48	0,38
3	1	20,05	149,59	169,64	136,99	80,75	4,09
1	1,5	30,18	39,59	69,77	90,79	130,13	0,30
2	1,5	30,18	84,59	114,77	125,21	109,10	3,91
3	1,5	30,18	149,59	179,77	184,62	102,70	1,68

Fonte: Da autora (2020).

^a Volume de trabalho da fração clorofórmica tomado durante a preparação da amostra (item 2.6.1.).

^b Quantidade (ng) de PTOX na amostra não fortificada.

^c Quantidade (ng) de PTOX na amostra não fortificada + Quantidade (ng) de PTOX adicionada = Quantidade teórica de PTOX.

^d Quantidade (ng) de PTOX determinada experimentalmente nas amostras fortificadas.

^e % recuperação = (quantidade experimental ÷ quantidade teórica) x 100.

3.5 Cultivo *in vitro* de raízes de *H. suaveolens* em meio líquido com AIB e ANA

A suplementação e concentrações de AIB e ANA impactaram significativamente na produção de raízes e de PTOX em *Hyptis suaveolens*. Estatisticamente, a maior produção de raízes foi observada nos tratamentos 2,4 e 6 (TABELA 22). Entretanto, o tratamento 4 (1 mg L⁻¹ de AIB + 0,5 mg L⁻¹ de ANA) proporcionou maiores valores para matéria fresca (MFR) e seca (MSR) de raiz finais (6,49 g e 248,76 mg, respectivamente) e maior índice de crescimento fresco (ICMF) (15,21 vezes) e seco (ICMS) (20,28 vezes) (TABELA 22; FIGURA 13). O uso adequado de auxina desempenha um papel fundamental no enraizamento de muitas espécies, pois pode aumentar a quantidade de carboidratos transportados para a formação de raízes. Ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftaleno-acético (ANA) aumentaram as taxas de enraizamento e o número de raízes (AKAT; DEMIRKAN; TUNA, 2017).

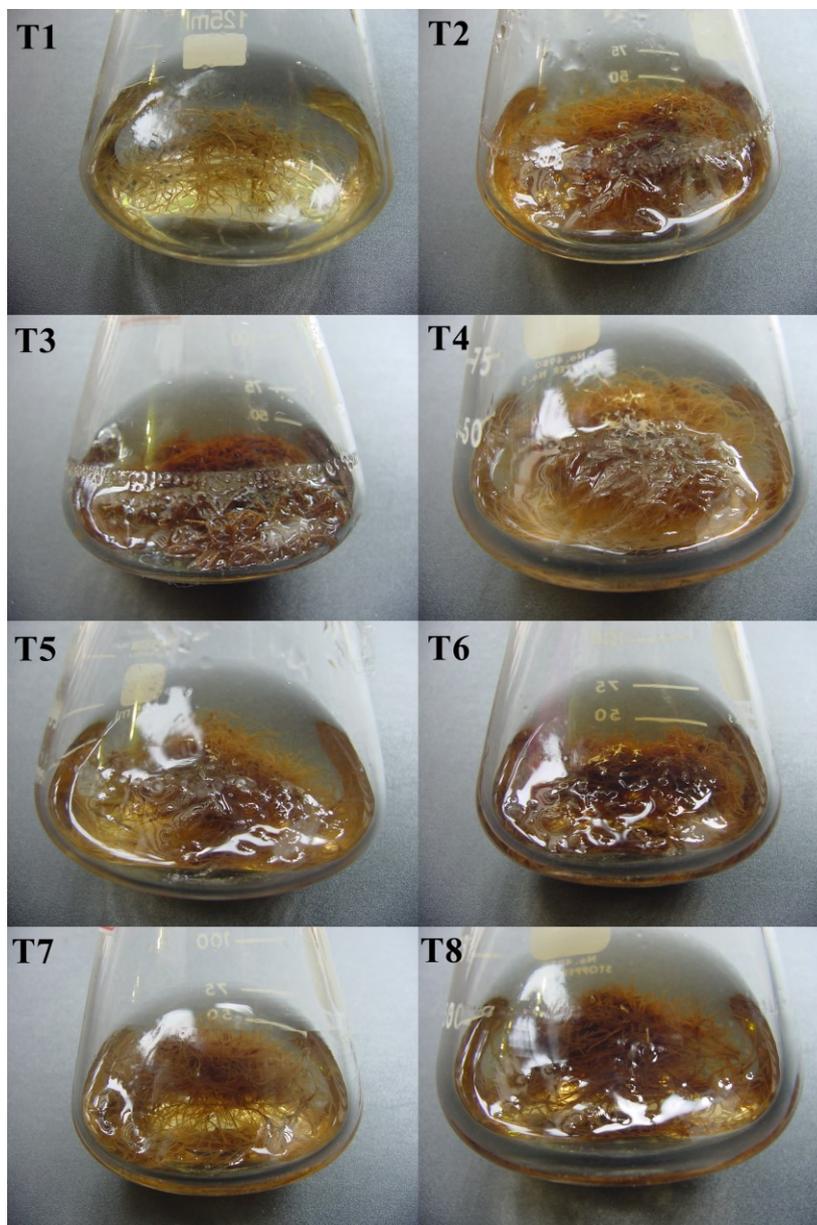
Tabela 22 - Matéria fresca de raiz final (MFR em g) e seca (MSR em mg), índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas in vitro em meio MS líquido suplementado com diferentes combinações de AIB e ANA. MFRI (matéria fresca de raiz inicial), MSRI (matéria seca de raiz inicial), ICMF (índice de crescimento de matéria fresca); ICMS (índice de crescimento de matéria seca).

Trat.	AIB mg L ⁻¹	ANA mg L ⁻¹	MFRI G	MSRI mg	MFR (g)	MSR (mg)	ICMF	ICMS
1	0,0	0,0	0,4	11,69	0,90 d	28,55 f	1,25 d	1,44 f
2	0,5	0,5	0,4	11,69	3,92 b	168,98 b	8,79 b	13,45 b
3	0,5	1,0	0,4	11,69	3,51 b	148,88 c	7,78 b	11,74 c
4	1,0	0,5	0,4	11,69	6,49 a	248,76 a	15,21 a	20,28 a
5	0,5	0,0	0,4	11,69	2,11 c	109,28 e	4,28 c	8,35 e
6	1,0	0,0	0,4	11,69	4,46 b	161,78 b	10,16 b	12,84 b
7	0,0	0,5	0,4	11,69	3,55 b	107,80 e	7,88 b	8,22 e
8	0,0	1,0	0,4	11,69	2,30 c	131,46 d	4,75 c	10,25 d

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 13 - Raízes de *Hyptis suaveolens* após o cultivo *in vitro* por 42 dias, em meio MS líquido suplementado com diferentes concentrações de AIB e ANA (mg L^{-1}), respectivamente: T1 = 0,0 (controle); T2 = 0,5 + 0,5; T3 = 0,5 + 1,0; T4 = 1,0 + 0,5; T5 = 0,5 + 0,0; T6 = 1,0 + 0,0; T7 = 0,0 + 0,5; T8 = 0,0 + 1,0.



Fonte: Da autora (2020).

A combinação de AIB e ANA é muito bem-sucedida para algumas espécies na produção de raízes *in vitro*, por exemplo, para o enraizamento de *Eriobotrya japonica*. No geral, a adição de auxina no meio de cultura causa mudanças na síntese proteica e produção de RNA que pode estimular o crescimento e a rápida divisão celular, aumentando o número de raízes (HASSAN *et al.*, 2018).

Em relação a PTOX encontrada na raiz ($\mu\text{g g}^{-1}$), observou-se que o tratamento controle (T1, sem reguladores de crescimento) apresentou a maior concentração ($211,66 \mu\text{g g}^{-1}$) (TABELA 23). Pode-se observar que o meio de cultura no qual foram cultivadas as raízes desse tratamento apresentou a menor concentração de PTOX ($0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$) dentre os outros meios. Sem a presença de reguladores de crescimento, houve menor produção e excreção de PTOX das raízes para o meio de cultura, assim, esse metabólito, provavelmente, continuou na raiz. Na Figura 14, estão apresentados os cromatogramas obtidos por CLAE - DAD (Raízes) TR PTOX = 2,8 minutos, na Figura 15, a coloração do meio de cultura e na Figura 16 os cromatogramas obtidos por CLAE - DAD (Meio de cultura líquido). TR PTOX = 2,8 minutos.

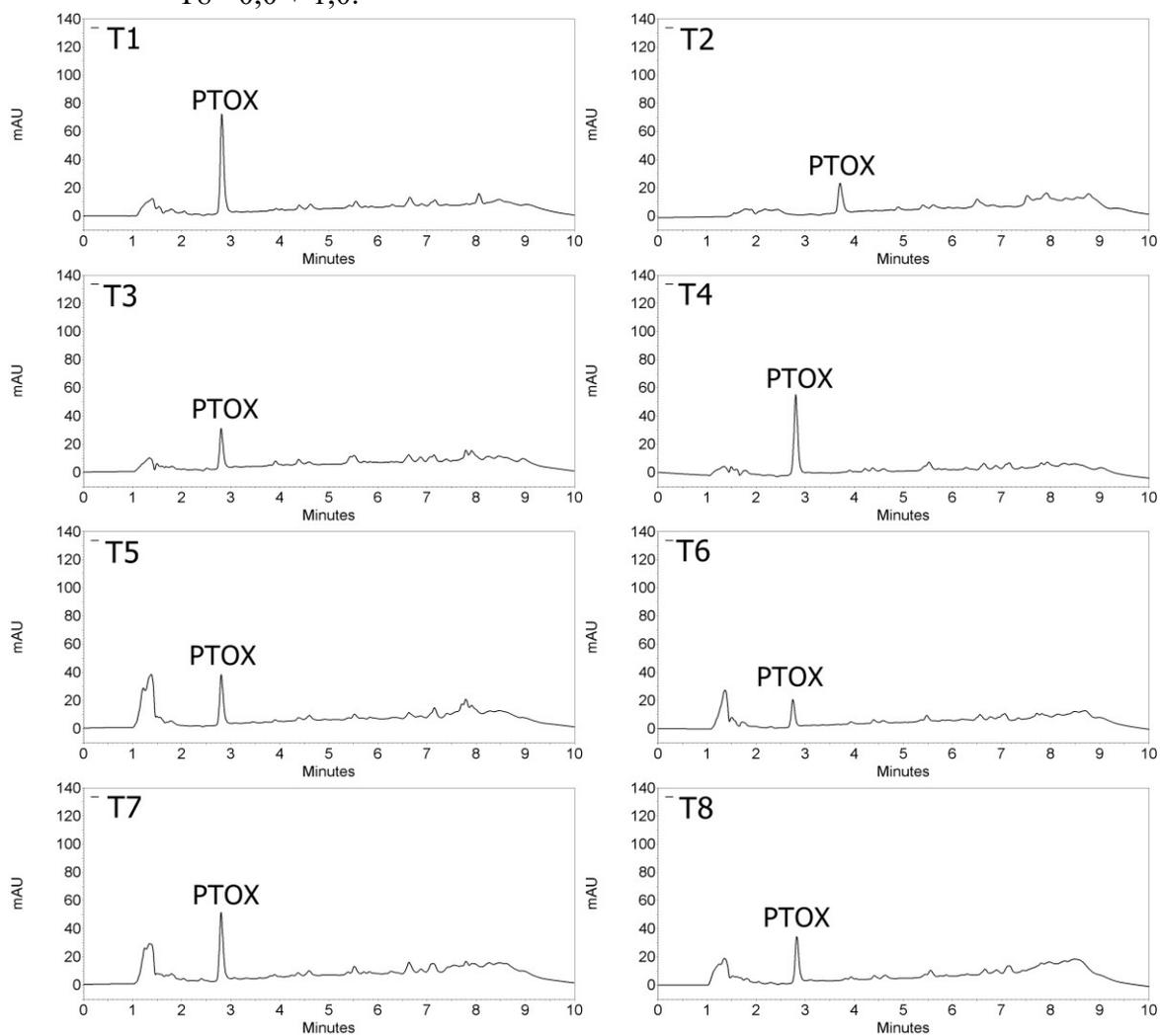
Tabela 23 - Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX na Raiz, em $\mu\text{g g}^{-1}$), no meio de cultura (PTOX no Meio, em $\mu\text{g mL}^{-1}$), na raiz total produzida pelos tratamentos (PTOX Total na raiz seca, em μg), total no meio de cultura de cada tratamento (PTOX Total no Meio, em μg) e PTOX total incluindo a da raiz e a do meio de cultura (PTOX Total (Raiz + Meio), em μg).

Trat.	AIB (mg L^{-1})	ANA (mg L^{-1})	PTOX Raiz ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PTOX Meio ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Peso Seco raiz (g)	Valor Total PTOX Raiz Seca (μg)	Valor Total PTOX Meio (μg)	PTOX Raiz + Meio (μg)
1	0,0	0,0	211,66 a	0,06 g	0,03 e	6,01 c	2.19 g	8.20 d
2	0,5	0,5	72,20 g	0,40 d	0,17 b	12,03 b	15.89 d	27.92 c
3	0,5	1,0	86,04 f	0,33 e	0,15 c	12,77 b	13.34 e	26.11 c
4	1,0	0,5	179,97 b	0,73 a	0,25 a	45,23 a	29.15 a	74.38 a
5	0,5	0,0	108,06 d	0,50 b	0,10 d	11,34 b	20.12 b	31.47 b
6	1,0	0,0	54,44 h	0,45 c	0,16 b	8,82 c	18.13 c	26.96 c
7	0,0	0,5	144,76 c	0,41 d	0,11 d	15,27 b	16.53 d	31.80 b
8	0,0	1,0	100,15 e	0,29 f	0,14 c	13,53 b	11.79 f	25.32 c

Fonte: Da autora (2020).

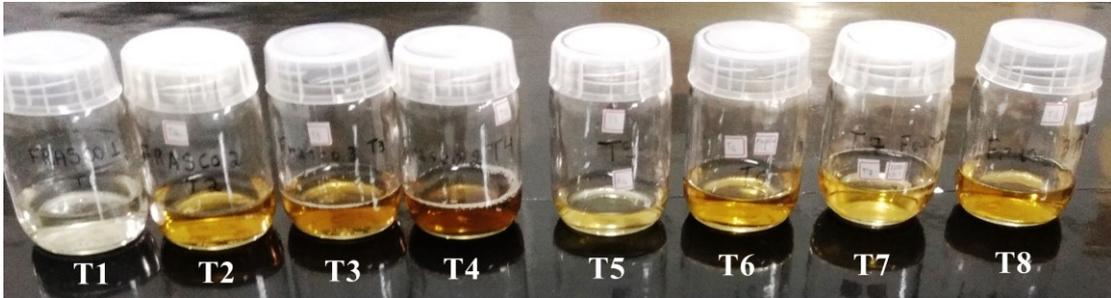
As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Valor total: correspondente ao valor obtido em 1 erlenmeyer.

Figura 14 - Cromatogramas obtidos por CLAE - DAD (Raízes). TR PTOX = 2,8 minutos. Os meios foram suplementados com diferentes concentrações de AIB e ANA, respectivamente descritas a seguir (em mg L⁻¹): T1 = 0,0 (controle)/ T2 = 0,5 + 0,5; T3 = 0,5 + 1,0; T4 = 1,0 + 0,5; T5=0,5 + 0,0; T6= 1,0 + 0,0; T7= 0,0 + 0,5; T8= 0,0 + 1,0.



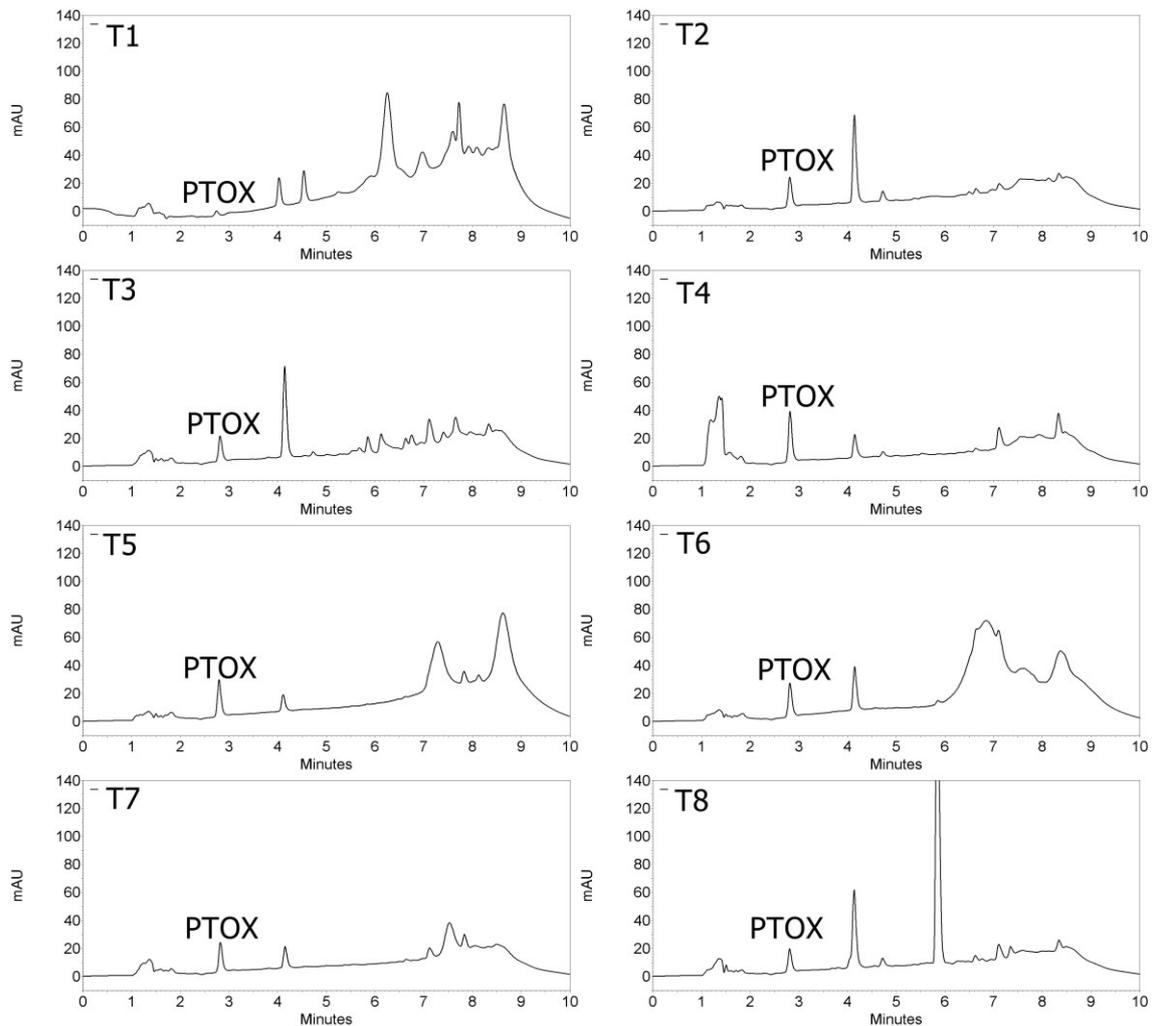
Fonte: Da autora (2020).

Figura 15 - Meios de cultura líquidos MS após o cultivo *in vitro* de raízes de *H.suaveolens* dentro deles por 42 dias. Os meios foram suplementados com diferentes concentrações de AIB e ANA, respectivamente descritas a seguir (em mg L⁻¹): T1 = 0,0;0,0 (controle)/ T2 = 0,5; 0,5/ T3 = 0,5;1,0/T4 = 1,0;0,5/T5=0,5;0,0/T6= 1,0;0,0/T7= 0;0,5/T8= 0;1,0.



Fonte: Da autora (2020).

Figura 16 - Cromatogramas obtidos por CLAE - DAD (Meio de cultura líquido). TR PTOX = 2,8 minutos. Os meios foram suplementados com diferentes concentrações de AIB e ANA, respectivamente descritas a seguir (em mg L⁻¹): T1 = 0,0;0,0 (controle)/ T2 = 0,5; 0,5/ T3 = 0,5;1,0/T4 = 1,0;0,5/T5=0,5;0,0/T6= 1,0;0,0/T7= 0;0,5/T8= 0;1,0.



Fonte: Da autora (2020).

Por outro lado, a PTOX presente no meio de cultura foi maior ($0,73 \mu\text{g mL}^{-1}$) no tratamento 4 (1 mg L^{-1} de AIB + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA) (TABELA 23) (FIGURA 16). Conforme descrito anteriormente, o tratamento 4 também proporcionou maior ganho de massa de raízes e produção de PTOX total ($74,38 \mu\text{g}$).

No trabalho de Nikule *et al.* (2020), com a espécie *Phyllanthus tenellus*, a análise quantitativa por CLAE mostrou que o conteúdo de lignana era variável com auxinas e citocininas incorporadas ao meio. O teor de lignana foi maior em calos cultivados em meio MS suplementado com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. De acordo com Anjum, Abbasi e Hano (2017), informações sobre a biossíntese, acumulação e regulação de PTOX em culturas *in vitro* de plantas são limitadas. Em seu trabalho, estes autores verificaram que ANA aumenta a produção de lignanas em cultura de calos de *Linum usitatissimum* L.

3.6 Cultivo *in vitro* de raízes de *H. suaveolens* em meio líquido com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol

Os resultados obtidos neste experimento mostraram que ocorreu maior matéria fresca (MFR) e seca finais de raízes (MSR) quando estas foram cultivadas nos tratamentos MS líquido com metade da concentração indicada de vitaminas e mio-inositol e em meio MS líquido padrão. A adição de vitaminas e mio-inositol ao meio de cultura se mostrou necessária. Entretanto, em quantidade duas vezes maior que a indicada na formulação do meio MS, foram prejudiciais ao crescimento (TABELA 24).

Tabela 24 - Matérias frescas e secas finais de raízes (mg) de *H. suaveolens* obtidas após o cultivo das mesmas em meio líquido MS com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol por 44 dias.

Trat.	Descrição	MFR (mg)	MSR (mg)
T1	MS sem vitaminas e sem mio-inositol	1306,80 b	115,66 c
T2	MS metade vitaminas e metade de mio-inositol	1999,20 a	198,88 b
T3	MS normal	2397,60 a	258,90 a
T4	MS dobro de vitaminas e mio-inositol	1123,20 b	131,94 c

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

A adição de vitaminas e mio-inositol ao meio de cultura foi essencial para o crescimento das raízes devido as funções que estes constituintes apresentam. De acordo com George, Hall e De Klerk (2008), vitaminas são necessárias para células vegetais como intermediárias essenciais ou catalisadoras metabólicas. Já o mio-inositol está relacionado a biogênese da parede celular, armazenamento de auxina, síntese de ácido fítico, síntese de oligossacarídeos e tolerância a estresse (SHARMA; CHAUDHARY; KHURANA, 2020).

Em relação à quantificação de PTOX (TABELA 25), o tratamento meio MS líquido sem vitaminas e sem mio inositol foi o que apresentou o melhor resultado ($7,50 \mu\text{g g}^{-1}$), seguido pelo tratamento MS com metade de vitaminas e metade de mio-inositol ($6,01 \mu\text{g g}^{-1}$). Entretanto, o tratamento sem vitaminas e mio-inositol apresentou baixa produção de matéria seca ($115,66 \text{ mg}$) (TABELA 24). Na Figura 17, estão apresentados os cromatogramas obtidos. Pode-se observar que, além da PTOX, os métodos extrativo e cromatográfico possibilitaram a separação de poucas substâncias. Na Figura 18, apresentada, a seguir, estão apresentados os meios de cultura após o cultivo das raízes dentro deles. Em nenhum tratamento foi detectada a presença de PTOX no meio. Não houve quantidade de PTOX detectável no meio de cultura.

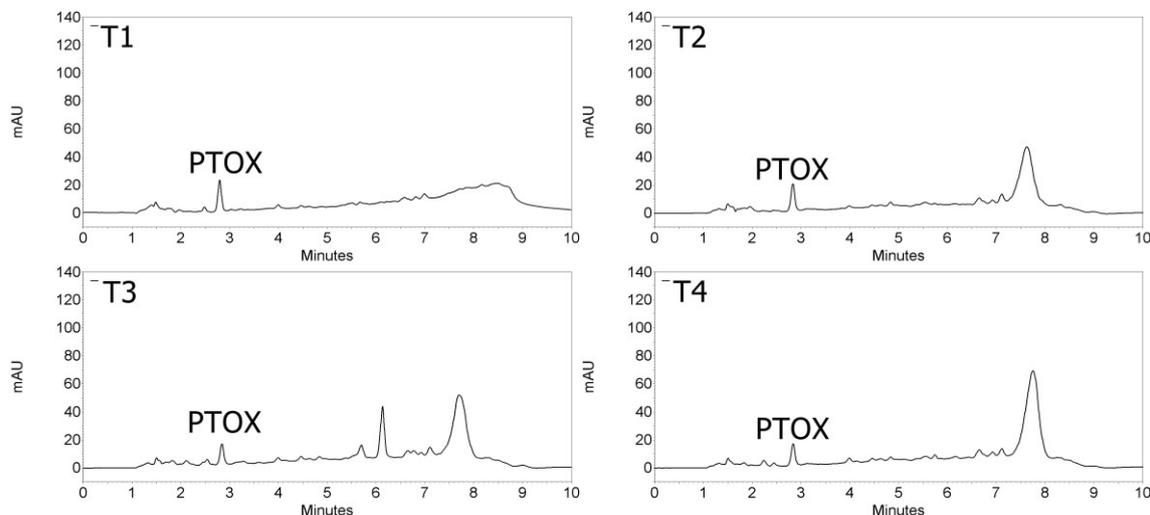
Tabela 25 - Quantificação de PTOX ($\mu\text{g g}^{-1}$) em raízes de *H.suaveolens* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS líquido com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol por 44 dias.

Tratamentos	Descrição	PTOX ($\mu\text{g g}^{-1}$)
T1	MS sem vitaminas e sem mio-inositol	7,50 a
T2	MS metade de vitaminas e metade de mio-inositol	6,01 b
T3	MS normal	4,54 d
T4	MS dobro de vitaminas e dobro de mio-inositol	5,09 c

Fonte: Da autora (2020).

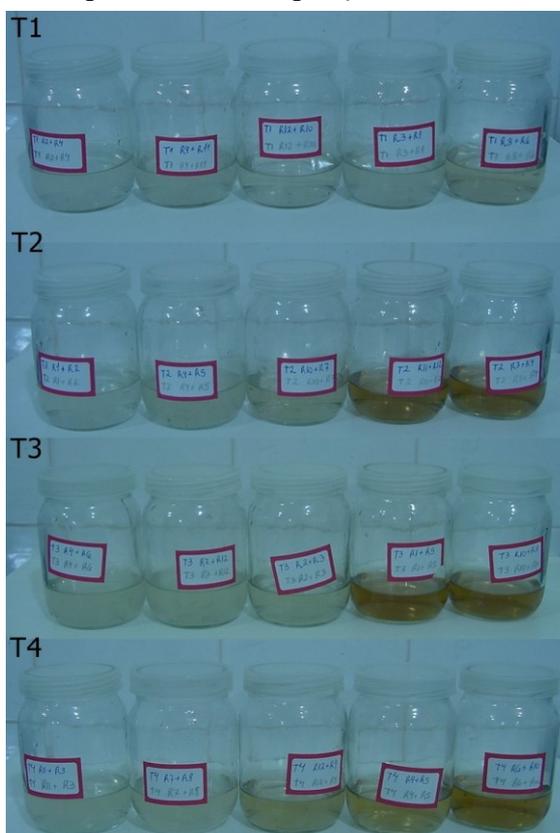
As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 17 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (quantificação de PTOX nas raízes). TR PTOX = 2,8 min. T1) MS sem vitaminas e sem mio-inositol, T2) MS metade vitaminas e metade mio-inositol, T3) MS normal, T4) MS dobro de vitaminas e mio-inositol.



Fonte: Da autora (2020).

Figura 18 - Meios de cultura líquidos após o cultivo *in vitro* de raízes de *H.suaveolens* nos mesmos, por 44 dias (MS com diferentes concentrações de vitaminas e mio-inositol). T1) MS sem vitaminas e sem mio-inositol, T2) MS metade vitaminas e metade mio-inositol, T3) MS normal, T4) MS dobro de vitaminas e mio-inositol. Na imagem estão apresentadas 5 repetições de cada tratamento.



Fonte: Da autora (2020).

A produção de lignanas pelos tecidos vegetais está relacionada a defesa e regulação do crescimento. Sua biossíntese é ajustada para que as plantas possam se adequar as suas condições de desenvolvimento (condição de água, reação às tensões) (BEHR *et al.*, 2018). Nesse experimento, a mudança na concentração de vitaminas e mio-inositol provavelmente não causou condição de estresse suficiente para produção de PTOX pela raiz que fosse excretada para o meio líquido.

Pode-se observar, além disso, nos dois experimentos deste trabalho, o escurecimento das raízes e do meio de cultura em diferentes proporções. A causa subjacente do escurecimento do tecido é o acúmulo e subsequente oxidação de compostos fenólicos no tecido e nos meios de cultura. Embora os compostos fenólicos estejam geralmente presentes em tecidos vegetais saudáveis e possam se acumular em tipos de células especializadas, eles são produzidos em maior abundância e / ou liberados como uma resposta de defesa, especialmente após ferimentos nos tecidos ou estresse (JONES; SAXENA, 2013).

4 CONCLUSÃO

O método cromatográfico desenvolvido e validado para a quantificação de PTOX em *H. suaveolens* apresentou linearidade, precisão, exatidão, robustez e seletividade adequadas. Foi aplicado, com sucesso, em amostras de raízes de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro*. A produção máxima dessa lignana ariltetralina é obtida a partir de cultura de raízes *in vitro* de *Hyptis suaveolens* em meio MS líquido, suplementado com 1 mg L⁻¹ de AIB + 0,5 mg L⁻¹ de ANA, por 42 dias. O cultivo de raízes em meio líquido com 50% da concentração original de vitaminas e mio inositol do meio de cultura (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é mais indicado para a espécie, apresentando, ao mesmo tempo, produção de matéria seca de raiz e PTOX.

REFERÊNCIAS

- AKAT, H.; DEMIRKAN, G. C.; TUNA, A. L. The effect of naphthalene acetic acid and some rooting media on rooting abilities and shoot growth of Dwarf Nerium cuttings. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 38, n. 5, p. 903-909, 2017.
- ANJUM, S.; ABBASI, B. H.; HANO, C. Trends in accumulation of pharmacologically important antioxidant-secondary metabolites in callus cultures of *Linum usitatissimum* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 129, p. 73-87, 2017.
- ARDALANI, H.; AVAN, A.; GHAYOUR-MOBARHAN, M. Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, Pardis, v. 7, n. 4, p. 285-294, 2017.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17th ed. Arlington: AOAC International, 2000.
- BEHR, M. *et al.* Insights into the molecular regulation of monolignol-derived product biosynthesis in the growing hemp hypocotyl. **BMC Plant Biology**, London, v. 18, n. 1, 2018. Disponível em: <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-017-1213-1>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017. Determina a publicação do "guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 141, 25 jul. 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 10 jun. 2020.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html. Acesso em: 10 jun. 2020.
- CANEL, C. *et al.* High yield of podophyllotoxin from leaves of *Podophyllum peltatum* by in situ conversion of podophyllotoxin 4-O-β-D-glucopyranoside. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 67, p. 97-99, 2001.
- CASTRO, M. A. *et al.* An overview on heterocyclic podophyllotoxin derivatives. **Targets in Heterocyclic Systems**, London, v. 19, p. 28-61, 2015.
- CHANDRAN, H. *et al.* Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. **Biotechnology Reports**, New York, v. 26, p. e00450, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X20300060?via%3Dihub>. Acesso em: 10 dez. 2020.

EBRAHIMI, M.; MOKHTARI, A. Engineering of secondary metabolites in tissue and cell culture of medicinal plants: an alternative to produce beneficial compounds using bioreactor technologies. *In*: ABDULLAH, S. N. A.; CHAI-LING, H.; WAGSTAFF, C. (ed.). **Crop improvement: sustainability through leading-edge technology**. Zürich: Springer, 2017. p. 137-167.

EPSHTEIN, N. A. System suitability requirements for liquid chromatography methods: controlled parameters and their recommended values: review. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, Zürich, v. 54, p. 518-525, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02231-w>.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. *In*: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Zürich: Springer, 2008. p. 115-173.

GREEN, J. M. Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 68, n. 9, p. 305A-309A, 1996. DOI: 10.1021/ac961912f.

HASSAN, M. A. *et al.* Effects of plant growth regulators on root culture and yeast extract elicitation on metabolite profiles of polygonum minus. **Sains Malaysiana**, Bangi, v. 47, n. 12, p. 3085-3094, 2018.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **ICH harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96)**. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

ISAH, T. Production of camptothecin in the elicited callus cultures of *Nothapodytes nimmoniana* (J. Graham) Mabberly. **Chemical Papers**, Bratislava, v. 71, n. 6, p. 1091-1106, 2017.

ISAH, T. *et al.* Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 132, n. 2, p. 239-265, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-017-1332-2>.

JONES, A. M. P.; SAXENA, P. K. Inhibition of Phenylpropanoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 10, Oct. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24116165>. Acesso em: 10 jun. 2020.

KUMARI, A.; SINGH, D.; KUMAR, S. Biotechnological interventions for harnessing podophyllotoxin from plant and fungal species: current status, challenges, and opportunities for its commercialization. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 37, n. 6, p. 739-753, 2017.

LIU, W. *et al.* Genetic diversity and structure of *Sinopodophyllum hexandrum* (royle) ying in the qinling mountains, china. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 10, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110500>. Acesso em: 10 jun. 2020.

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

NGOZI, L. The efficacy of *hyptis suaveolens*: a review of its nutritional and medicinal applications. **European Journal of Medicinal Plants**, London, v. 4, n. 6, p. 661-674, 2014.

NIKULE, H. A. *et al.* In-vitro propagation, callus culture and bioactive lignan production in *Phyllanthus tenellus* Roxb: a new source of phyllanthin, hypophyllanthin and phyltetralin. **Scientific Reports**, London, v. 10, p. 10668, June 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-67637-8>. Acesso em: 10 dez. 2020.

PADALIA, H.; SRIVASTAVA, V.; KUSHWAHA, S. P. S. Modeling potential invasion range of alien invasive species, *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. in India: Comparison of MaxEnt and GARP. **Ecological Informatics**, New York, v. 22, p. 36-43, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoinf.2014.04.002>.

PRINCE, S. P. *et al.* *Hyptis suaveolens* (L.) poit: a phyto-pharmacological review. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, New Delhi, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2013.

SADEK, P. C. **Troubleshooting HPLC Systems: a bench manual**. New York: Wiley, 2000.

SHARMA, N.; CHAUDHARY, C.; KHURANA, P. Role of myo-inositol during skotomorphogenesis in *Arabidopsis*. **Nature Research**, London, v. 10, n. 1, p. 17329, Oct. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33060662/#:~:text=Abstract,a%20ubiquitous%20metabolite%20of%20plants.&text=In%20this%20study%2C%20we%20demonstrate,by%20supplementation%20assays%20and%20qPCR>. Acesso em: 10 fev. 2021.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Selection of high-yielding cell lines. *In*: SINGH, B.; SHARMA, R. A. **Secondary metabolites of medicinal plants**. Berlin: Wiley-VCH Verlag, 2020. v. 3, p. 1468-1469.

SNYDER, C. R. *et al.* The development and validation of the Children's Hope Scale. **Journal of Pediatric Psychology**, Washington, DC, v. 22, n. 3, p. 399-421, June 1997. DOI: 10.1093/jpepsy/22.3.399.

TANG, G. *et al.* Studies on the chemical compositions of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **Journal of the Serbian Chemical Society**, Belgrade, v. 84, n. 3, p. 245-252, 2019.

UNITED States Pharmacopoeia. 29th ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2006.

VELÓZ, R. A.; TAKETA, A. C.; VILLAREAL, M. L. Production of podophyllotoxin from roots and plantlets of *Hyptis suaveolens* cultivated *in vitro*. **Pharmacognosy Research**, Bangalore, v. 5, n. 2, p. 93-102, 2013.

ZHELJAZKOV, V. D. *et al.* Bioprospecting for podophyllotoxin in the Big Horn Mountains, Wyoming. **Industrial Crops and Products**, London, v. 43, p. 787-790, 2013.

**ARTIGO 2 - PRODUÇÃO *IN VITRO* DE PODOFILOTOXINA POR RAÍZES
ADVENTÍCIAS DE *Hyptis suaveolens***

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o
Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

RESUMO

Podofilotoxina (PTOX) é uma lignana ariltetralina utilizada mundialmente para o tratamento de lesões de pele, como verrugas, vírus do papiloma humano e infecções genitais. *Hyptis suaveolens* apresenta PTOX em suas raízes. A cultura *in vitro* de tecidos vegetais tem sido, cada vez mais, empregada para produzir compostos medicinais raros e de alta qualidade. Raízes adventícias são fontes atraentes de fitoquímicos devido à sua estabilidade genética e biossintética. Assim, objetivou-se, no presente trabalho, investigar a indução de raízes adventícias em folhas sob diferentes qualidades de luz, sistemas de ventilação natural, e em folhas e segmentos nodais de *H. suaveolens* sob diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA, totalizando três experimentos. No primeiro experimento, em folhas de *H. suaveolens* cultivadas em meio MS semissólido, apenas na ausência de luz e sob luz LED vermelha ocorreu formação de raízes adventícias. As matérias secas de raízes obtidas nesses tratamentos foram estatisticamente iguais, ou seja, 21,84 e 29,81mg, respectivamente. A quantificação de PTOX foi realizada nos tratamentos ausência de luz (10,72 $\mu\text{g g}^{-1}$) e LED vermelho (9,93 $\mu\text{g g}^{-1}$). No segundo experimento, o tratamento ausência de luz sem membranas possibilitou maior matéria seca de raízes (84,02 mg) e PTOX (46,68 $\mu\text{g g}^{-1}$). No terceiro experimento, as concentrações de AIB e ANA (0,5; 1,0 e 2,0 mg L^{-1}) induziram a formação de raízes adventícias em folhas da espécie. O tratamento 2,0 mg L^{-1} de ANA possibilitou a formação de maior matéria seca de raízes (45,53 mg). O tratamento 1,0 mg L^{-1} de AIB produziu mais PTOX (9,96 $\mu\text{g g}^{-1}$ de raiz). Em segmentos nodais de *H. suaveolens*, as concentrações de AIB e ANA (0,5; 1,0 e 2,0 mg L^{-1}) também induziram a formação de raízes adventícias. O tratamento 0,5 mg L^{-1} de AIB possibilitou maior matéria seca de raízes (37,62 mg). Os tratamentos 1 e 2 mg L^{-1} de ANA resultaram em baixa matéria seca de raízes e alta porcentagem de calos (100 e 90%, respectivamente). A PTOX foi maior sob os tratamentos 1,0 e 2,0 mg L^{-1} de ANA (9,97 e 9,95 $\mu\text{g g}^{-1}$ de raiz, respectivamente). Para a maior obtenção de PTOX, indica-se o cultivo de folhas de *H. suaveolens* sob ausência de luz. Para a indução de raízes adventícias em folhas em meio MS semissólido e produção de PTOX, na ausência de luz, o meio pode ser suplementado com 1,0 mg L^{-1} de ANA. No caso de o explante utilizado ser segmento nodal, indica-se 0,5 mg L^{-1} de AIB.

Palavras-chave: Raízes adventícias. Qualidade de luz. Ventilação Natural. Lignana. Regulador de crescimento.

ABSTRACT

Podophyllotoxin (PTOX) is an ariltetraline lignan used worldwide for the treatment of skin lesions, such as warts, human papilloma virus and genital infections. *H. suaveolens* has PTOX in its roots. The *in vitro* culture of plant tissues is being increasingly used to produce rare and high quality medicinal compounds. Adventitious roots are attractive sources of phytochemicals due to their genetic and biosynthetic stability. Thus, the objective of this study was to investigate the induction of adventitious roots in leaves under different qualities of light, natural ventilation systems, and in leaves and nodal segments of *H. suaveolens* under different concentrations of 2,4-D, IBA and NAA, totaling three experiments. In the first experiment, in leaves of *H. suaveolens* grown in a semi-solid MS medium, only in the absence of light and under red LED light did adventitious root formation occur. The root dry matter obtained in these treatments were statistically equal, being 21.84 and 29.81mg, respectively. The quantification of PTOX was performed in the absence of light ($10.72 \mu\text{g g}^{-1}$) and red LED ($9.93 \mu\text{g g}^{-1}$) treatments. In the second experiment, the absence of light treatment without membranes allowed greater root dry matter (84.02mg) e PTOX ($46,68 \mu\text{g g}^{-1}$). In the third experiment, the concentration of IBA and NAA (0.5, 1.0 and 2.0 mg L^{-1}) induced the formation of adventitious roots in leaves of the species. The treatment 2.0 mg L^{-1} of NAA enabled the formation of greater root dry matter (45.53 mg). The treatment 1.0 mg L^{-1} of AIB produced more PTOX ($9.96 \mu\text{g g}^{-1}$ of root). In nodal segments of *H. suaveolens*, the concentrations of IBA and NAA (0.5, 1.0 and 2.0 mg L^{-1}) also induced the formation of adventitious roots. The treatment of 0.5 mg L^{-1} of IBA enabled greater root dry matter (37.62 mg). The treatments 1 and 2 mg L^{-1} of NAA resulted in low root dry matter and high percentage of calluses (100 and 90%, respectively). A PTOX foi maior sob os tratamentos 1,0 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA ($9,97$ e $9,95 \mu\text{g g}^{-1}$ de raiz, respectivamente). In order to obtain PTOX more, the cultivation of leaves in the absence of light is recommended. For the induction of adventitious roots in *H. suaveolens* leaves in a semi-solid MS medium and PTOX production, in the absence of light, the medium can be supplemented with 1.0 mg L^{-1} of NAA. If the explant used is a nodal segment, 0.5 mg L^{-1} of IBA is indicated.

Keywords: Adventitious roots. Light quality. Natural ventilation. Lignan. Growth regulator.

1 INTRODUÇÃO

Hyptis suaveolens (Lamiaceae) apresenta podofilotoxina (PTOX) em suas raízes (VELOZ; CARDOSO-TAKETA; VILLARREAL, 2013). PTOX é uma lignana ariltetralina altamente valorizada, que é utilizada mundialmente para o tratamento de várias lesões de pele, como verrugas, vírus do papiloma humano e infecções genitais. PTOX também é empregada como um precursor de produto natural para a produção de quimioterapias anticâncer, incluindo os derivados semissintéticos etoposídeo, fosfato de etoposídeo e teniposídeo. Esses compostos fornecem tratamento para câncer de pulmão, cervical e testicular, bem como neuroblastoma, hepatoma e leucemias (LI *et al.*, 2018).

A alta demanda de derivados de PTOX para quimioterapia causa forte pressão nas fontes naturais, como *Podophyllum hexandrum* e *Podophyllum peltatum*. A maior concentração de PTOX é encontrada nas raízes de *P. hexandrum*, com rendimento de até 6,6% em peso seco. A colheita excessiva resultou na inclusão de *P. hexandrum* na Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Extinção (CITES). A síntese química de PTOX é difícil devido à presença de quatro centros quirais contíguos e uma porção de trans-lactona sensível a bases. Como alternativa, culturas de células em suspensão têm sido exploradas, mas produzem apenas pequenas quantidades de PTOX (máx. 0,65% em peso seco) (SEEGERS; SETROIKROMO; QUAX, 2017).

Além disso, suas linhagens celulares apresentam comportamento imprevisível. Assim, células diferenciadas, ou seja, órgãos como brotos, raízes transformadas, raízes adventícias e embriões evoluíram como sistemas sustentáveis para a produção de metabólitos. No entanto, a indução de brotos e embriões e posterior cultivo em biorreatores não são convenientes na maioria das plantas. A indução e o cultivo de raízes transformadas são possíveis em um grande número de plantas. Entretanto, a segurança e eficácia dos produtos dessas raízes são as principais preocupações quando os produtos obtidos são usados como ingredientes alimentícios, farmacêuticos e nutracêuticos. Por outro lado, raízes adventícias são fontes atraentes de fitoquímicos devido à sua estabilidade genética e biossintética (MURTHY *et al.*, 2019).

Os processos envolvidos na formação dessas raízes são complexos e ocorrem em quatro estágios. O primeiro é a ativação, no qual as células tornam-se competentes para responderem a fatores de sinal, o segundo é a indução, quando a reativação do ciclo celular leva progressivamente para a formação do primórdio e a divisão celular é visível, o terceiro é

a ativação do primórdio da raiz e formação progressiva de novos tecidos. O quarto é o crescimento externo, onde o primórdio da raiz se alonga e conexões vasculares são estabelecidas. As auxinas promovem a ativação de células competentes e, em seguida, a formação do primórdio de raiz adventícia. Em contraste, a citocinina e o ácido giberélico têm um efeito inibitório no enraizamento adventício (LEGUÉ; RIGAL; BHALERAO, 2014).

Ferramentas biotecnológicas, como cultura *in vitro* de tecidos vegetais e transformação genética de plantas, são, cada vez mais, empregadas para produzir compostos medicinais raros e de alta qualidade. O uso adequado dessas tecnologias requer estudos para possibilitar um melhor controle do desenvolvimento vegetal *in vitro* e produção de compostos. Fatores bióticos ou abióticos são responsáveis por desencadear a síntese dos metabólitos de interesse. As técnicas *in vitro*, quando comparadas ao cultivo convencional de plantas, apresentam as vantagens de produzir compostos em condições ambientais estéreis e controladas (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019).

Assim, no presente trabalho, teve como objetivos a indução de raízes adventícias em folhas sob diferentes qualidades de luz e sistemas de ventilação natural e, folhas e segmentos nodais de *H.suaveolens* sob diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA para avaliar a indução e crescimento do sistema radicular na produção de podofilotoxina (PTOX).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução de raízes adventícias em folhas sob diferentes qualidades de luz

Plântulas de 48 dias após a inoculação de sementes foram as doadoras de explantes para este experimento. Utilizaram-se folhas, com as bordas excisadas no tamanho de 1x1 cm. O meio de cultura básico utilizado neste experimento foi o MS com 0,25 mg L⁻¹ de AIB, 2 mg L⁻¹ de ANA, 30 g L⁻¹ de açúcar e 5,5 g L⁻¹ de ágar. Os tratamentos foram diferentes qualidades de luz: T1) LED vermelho, T2) LED azul, T3) LED branco, T4) Fluorescente, T5) Ausência de luz. Inocularam-se 4 explantes por frasco (250 mL), em cada frasco foi adicionado 45 mL de meio de cultura. Aos 42 dias, o experimento foi avaliado. As variáveis respostas analisadas foram: matéria fresca e seca de raiz, número de raízes, tamanho de raízes e teor de PTOX das raízes.

2.2 Indução de raízes em folhas sob diferentes qualidades de luz e sistemas de ventilação natural

Neste experimento foram realizados 6 tratamentos: 2 tipos de sistemas de ventilação (tampa sem membrana porosa e tampa com 4 membranas porosas) e 3 qualidades de luz (vermelho, ausência de luz e 2,5 vermelho:1 azul”). Os explantes utilizados foram folhas retiradas de plântulas de 46 dias após a inoculação de sementes. O meio de cultura utilizado foi o MS com 0,25 mg L⁻¹ de AIB, 2 mg L⁻¹ de ANA, 30g L⁻¹ de sacarose e pH ajustado para 5,7 ± 0,1. Ver-teu-se por frasco, 45 mL de meio de cultura. O experimento foi avaliado aos 48 dias.

2.3 Indução de raízes adventícias em folhas e segmentos nodais de *H. suaveolens* sob diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA

Os explantes folhas e segmentos nodais foram retirados de plântulas de 45 dias. Utilizaram-se folhas com as bordas excisadas no tamanho de 1x1 cm. Realizaram-se 18 tratamentos, 3 tipos de reguladores de crescimento (2,4-D; AIB e ANA), 3 concentrações (0,5; 1 e 2 mg L⁻¹) e 2 tipos de explantes (folha e segmento). O meio básico utilizado foi o meio MS, com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ ágar e pH ajustado para 5,7 ± 0,1. O meio de cultura (45 mL) foi acondicionado em frasco de vidro (250 mL) e autoclavado. Os explantes

foram mantidos sob ausência de luz e avaliou-se o experimento aos 48 dias. As variáveis respostas analisadas foram: presença de calos, matéria fresca e seca de raiz, número de raízes, tamanho de raízes e teor de PTOX das raízes.

2.4 Extração de PTOX

A metodologia extrativa utilizada neste trabalho foi a validada anteriormente (item 2.6.1). Utilizaram-se 25 mg de raiz seca pulverizada, 5 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 (25mM), 10 mL de clorofórmio (no total) e filtragem à vácuo, sendo a extração realizada por sonicação, em 2 ciclos.

2.5 Preparo das amostras para CLAE

Adicionou-se 1 mL de metanol grau CLAE ao extrato clorofórmico concentrado, direto no béquer de secagem. Procedeu-se a solubilização das amostras, com auxílio de banho de ultrassom, por 2 min, e em seguida, centrifugou-se a 10000 rpm, por 10 min. Foi injetado 10 µL da amostra automaticamente.

2.6 Condição cromatográfica estabelecida

A condição cromatográfica estabelecida para a quantificação de PTOX em extrato de raízes de *H. suaveolens* inclui o uso de coluna Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm d.i. 5 µm), temperatura da coluna de 25 °C, fase móvel constituída por água Milli-Q e acetonitrila grau CLAE, ambas contendo 0,1% de ácido fosfórico, conforme descrito na Tabela 1, fluxo: 1 mL min⁻¹, comprimento de onda de detecção: 210 nm e volume de injeção de 10 µL.

Tabela 1 - Programa de eluição estabelecido para a quantificação de PTOX em extrato de raízes de *H.suaveolens*.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)	Modo de eluição
0	50	50	Gradiente
2,5	30	70	Gradiente
5	5	95	Gradiente
6	5	95	Isocrático
8	50	50	Gradiente
10	50	50	Isocrático

Fonte: Da autora (2020).

2.7 Análises estatísticas

Os dados dos experimentos foram analisados por análise de variância simples (ANOVA) e teste de Scott Knott no *software* R. Diferenças entre os grupos avaliados foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de raízes adventícias em folhas de *Hyptis suaveolens* cultivadas sob diferentes qualidades de luz

Verificou-se que apenas na ausência de luz e sob luz LED monocromática vermelha ocorreu formação de raízes adventícias nas folhas de *H. suaveolens* (TABELA 2, FIGURA 1). As matérias secas de raízes (MSR) obtidas nesses tratamentos foram estatisticamente iguais, ou seja, 21,84 e 29,81mg, respectivamente, por frasco (4 explantes).

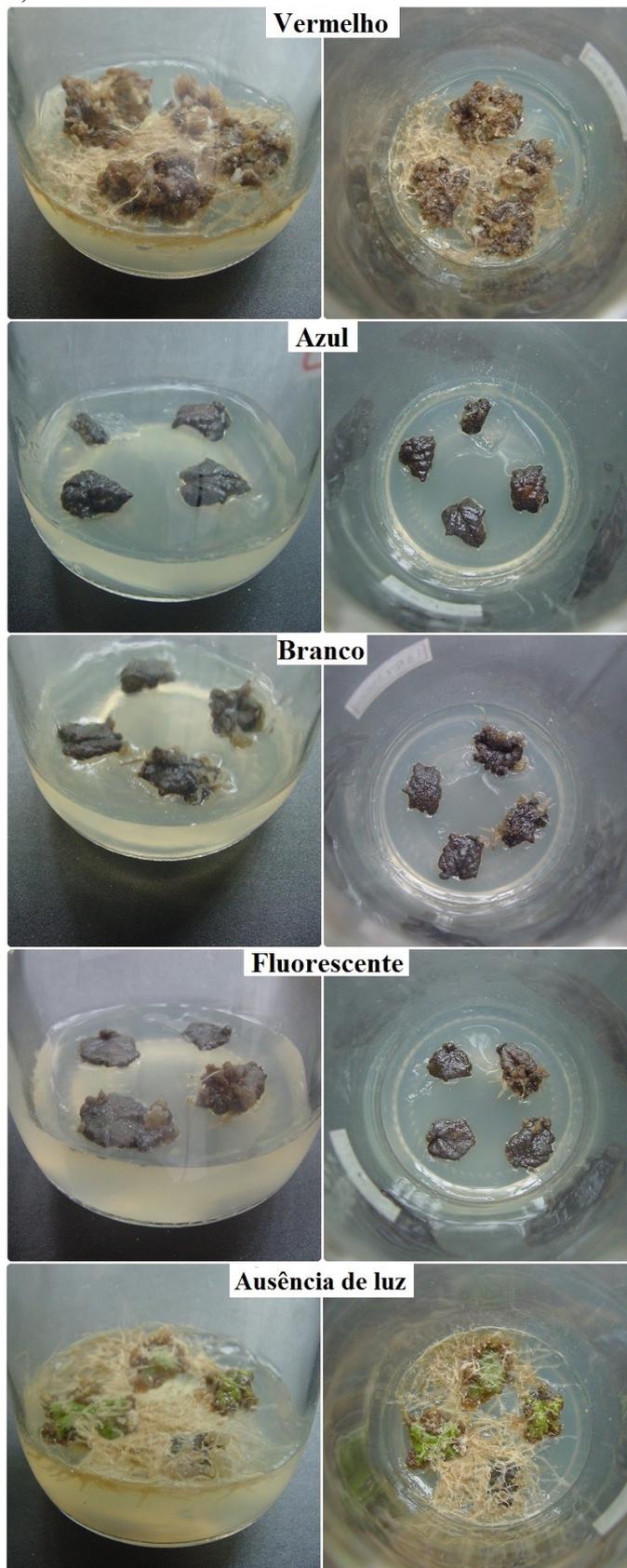
Tabela 2 - Número (NR), tamanho (TR) (cm) e matérias fresca (MFR)(mg) e seca de raízes (MSR) (mg) obtidas de folhas de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz.

Tratamento	NR	TR (cm)	MFR (mg)	MSR (mg)
Ausência de luz	19,00 a	2,23 a	438 a	21,84 a
LED Vermelho	11,00 b	1,85 a	274 b	29,81 a
Fluorescente	0,00 c	0,00 b	0,00 c	0,00 b
LED Branco	0,00 c	0,00 b	0,00 c	0,00 b
LED Azul	0,00 c	0,00 b	0,00 c	0,00 b

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade

Figura 1 - Indução de raízes adventícias em folhas de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz. T1 = LED Vermelho, T2 = LED Azul, T3 = LED Branco, T4 = Fluorescente, T5 = Ausência de Luz.



Fonte: Da autora (2020).

Monteuuis e Bom (2000) estudaram a influência da ausência de luz, fotoperíodo 16/8 e de auxinas adicionadas ao meio de cultura na capacidade de formação *in vitro* de raízes de *Acacia mangium*. O enraizamento do clone maduro foi significativamente aumentado pela exposição dos microestimulantes a auxinas (4 e 6 μM AIA ou AIB) na ausência de luz. A manutenção dos explantes em meio suplementado com auxina na ausência de luz resultou em um número maior de raízes adventícias formadas do que sob as condições de iluminação padrão 16/8. Por outro lado, o alongamento radicular foi estimulado pela luz.

Na natureza, as raízes crescem na ausência de luz (fototropismo negativo). Sua iluminação altera a resposta adequada aos hormônios ou estresse abiótico e fome de nutrientes, aumentando a inibição do crescimento da raiz. A iluminação da raiz além disso, induz uma explosão de espécies reativas do oxigênio (ERO). Entre outros processos, níveis elevados de ERO podem influenciar o equilíbrio entre a divisão e diferenciação celular, o crescimento da raiz e a emergência de raízes laterais (NAVAS *et al.*, 2015). Por outro lado, o fototropismo radicular positivo induzido pela luz vermelha foi relatado pela primeira vez em mudas de *Arabidopsis* cultivadas na luz (KISS *et al.*, 2003).

A quantificação de PTOX foi realizada nos tratamentos ausência de luz (10,72 $\mu\text{g g}^{-1}$) e LED vermelho (9,93 $\mu\text{g g}^{-1}$). A concentração de PTOX foi maior em valor absoluto sob o tratamento ausência de luz (TABELA 3, FIGURA 2). Efeito inibitório da luz na síntese de metabólitos secundários são relatados em muitas plantas medicinais (MIR *et al.*, 2017). Os efeitos de intensificação da luz vermelha na produção de PTOX podem estar correlacionados com o aumento das atividades da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) e a expressão de alguns genes importantes envolvidos na biossíntese de PTOX, incluindo o próprio gene PAL e o cinamoil-CoA gene da redutase (CCR) (YOUSEFZADI *et al.*, 2012).

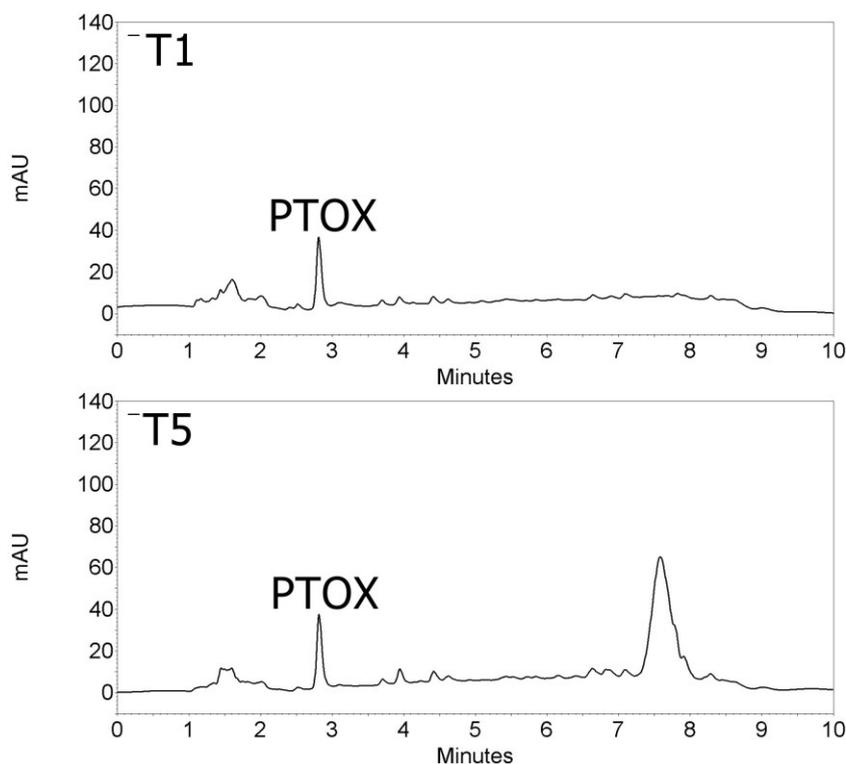
Tabela 3 - Quantificação de PTOX ($\mu\text{g g}^{-1}$ de raiz) nos tratamentos de qualidade de luz que possibilitaram obtenção de maior matéria seca de raízes adventícias obtidas a partir de folhas de *H.suaveolens*.

Tratamento	PTOX ($\mu\text{g g}^{-1}$ de raiz)
Ausência de Luz	10,72 a
LED Vermelho	9,93 a

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 2 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (quantificação de PTOX nas raízes). T1 = Ausência de Luz, T5 = LED vermelho.



Fonte: Da autora (2020).

3.2 Indução de raízes em folhas de *H. suaveolens* sob diferentes qualidades de luz e ventilação natural

Após verificado que a indução de raízes em folhas de *H. suaveolens* ocorre sob ausência de luz ou sob luz LED vermelha, investigaram-se o efeito de ventilação natural no seu crescimento e produção de PTOX. O tratamento 1 (ausência de luz sem membranas) possibilitou maior porcentagem de enraizamento (E) (90%) e matérias fresca (MFR) (1130 mg) e seca de raízes (MSR) (84,02mg) (TABELA 4) (FIGURA 3). A ausência de luz sem membranas e 2,5 vermelho 1 azul sem membranas proporcionaram maior concentração de PTOX (46,68 e 44,76 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente) (TABELA 5, FIGURA 4).

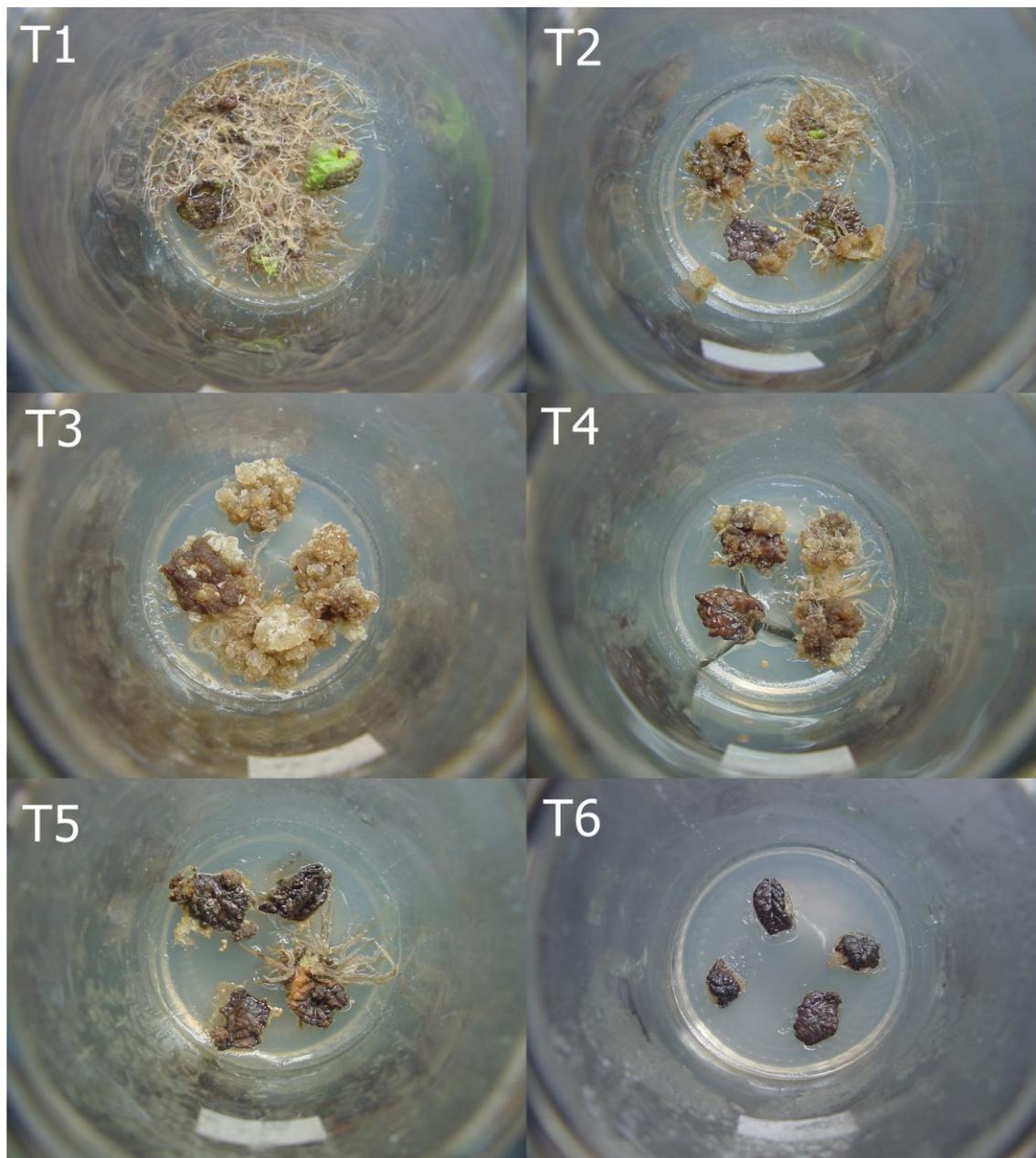
Tabela 4 - Matéria fresca de raízes (MFR) (mg), porcentagem de enraizamento (E) (%) e matéria seca de raízes (MSR) (mg) oriundas de folhas *H. suaveolens* cultivada *in vitro* sob diferentes sistemas de membranas.

Tratamento	Sistema	MFR (mg)	E (%)	MSR (mg)
1	Ausência de luz sem membranas	1130,00 a	90,00 a	84,02 a
2	Ausência de luz com 4 membranas	828,40 b	92,50 a	68,50 b
3	Vermelho sem membranas	335,45 c	37,50 b	25,94 c
4	Vermelho com 4 membranas	94,80 d	17,50 c	10,08 d
5	2,5 vermelho 1 azul sem membranas	92,70 d	22,50 c	6,16 d
6	2,5 vermelho 1 azul com 4 membranas	0,00 d	0,00 d	0,00 d

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 3 - Raízes de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz e sistemas de membranas. T1 = Ausência de luz sem membranas, T2 = Ausência de luz com 4 membranas, T3 = Vermelho sem membranas., T4 = Vermelho com 4 membranas, T5 = 2 vermelho:1 azul sem membranas, T6 = 2 Vermelho:1 azul com 4 membranas.



Fonte: Da autora (2020).

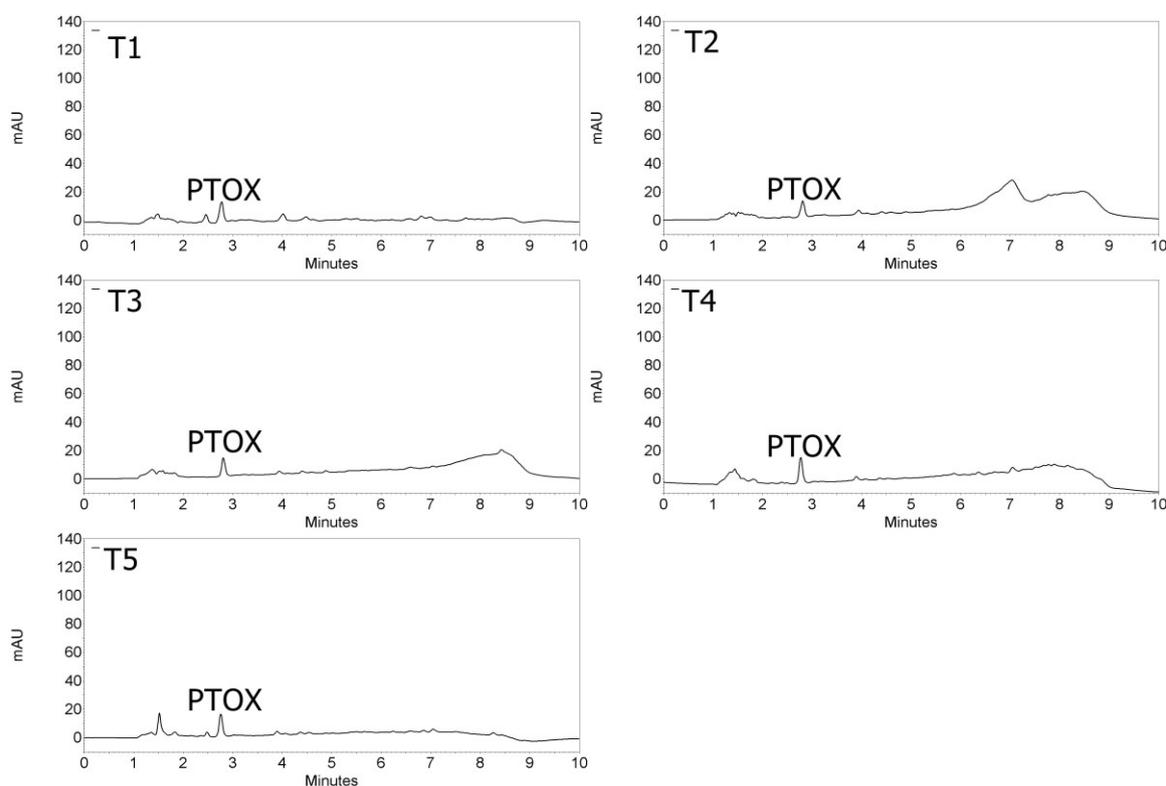
Tabela 5 - Quantificação de PTOX nas raízes adventícias originadas de folhas nos tratamentos de qualidade de luz e sistema de membranas.

Tratamento	Sistema	PTOX (ng mg ⁻¹)	PTOX (mg g ⁻¹)	PTOX (µg g ⁻¹)
1	Ausência de luz sem membranas	46,69 a	0,05 a	46,68 a
2	Ausência de luz com 4 membranas	36,51 b	0,04 b	36,51 b
3	Vermelho sem membranas	37,12 b	0,04 b	37,12 b
4	Vermelho com 4 membranas	39,60 b	0,04 b	39,60 b
5	2,5 vermelho 1 azul sem membranas	44,77 a	0,05 a	44,76 a

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 4 - Cromatogramas obtidos por CLAE - DAD (Quantificação de PTOX nas raízes). T1 = Ausência de Luz sem membranas, T2 = Ausência de Luz com 4 membranas, T3 = Vermelho sem membranas, T4 = Vermelho com 4 membranas, T5 = 2,5 vermelho 1 azul sem membranas.



Fonte: Da autora (2020).

3.3 Indução de raízes adventícias em folhas e segmentos nodais de *Hyptis suaveolens* em meio MS suplementado com 2,4-D, AIB e ANA

Verificou-se que o regulador de crescimento 2,4-D nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ induziu a formação de calos nas folhas (% Calos) (100%; 100% e 76%, respectivamente) (TABELA 6; FIGURA 5) e em segmentos nodais (66%; 31,5% e 20%, respectivamente) de *H suaveolens* (TABELA 7; FIGURA 6).

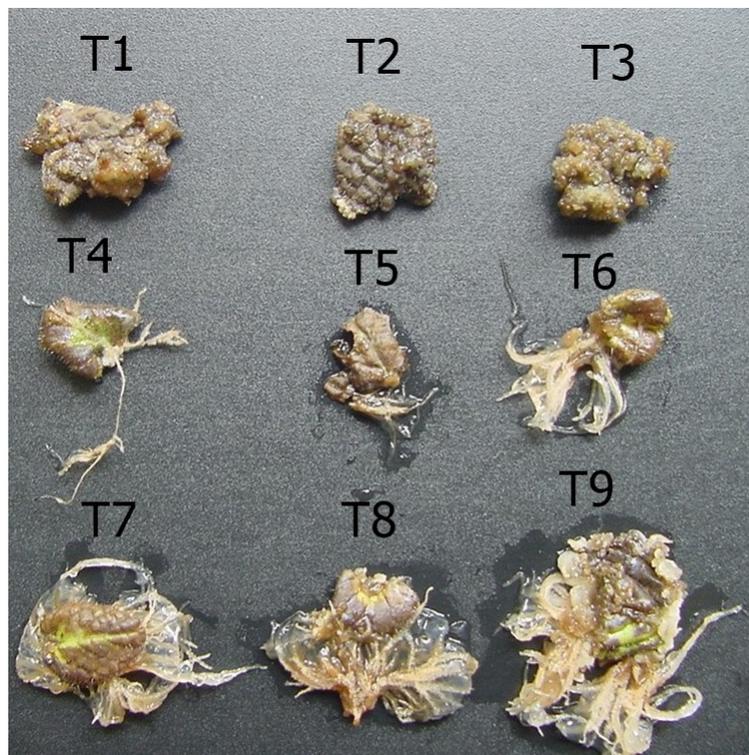
Tabela 6 - Porcentagem de calos (% Calos), número (NR), tamanho (TR) e matéria fresca (MFR) e seca (MSR) de raízes adventícias obtidas a partir de folhas de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* por 48 dias, em meio de cultura MS semissólido suplementado com diferentes concentrações de 2,4D, AIB e ANA.

Tratamentos (Explante Folha)	2,4-D (mgL ⁻¹)	AIB (mgL ⁻¹)	ANA (mgL ⁻¹)	Cobertura de Calos (%)	NR	TR (cm)	MFR (g) por frasco	MSR folha (mg)
1	0,5	0,0	0,0	100,0 a	0,0 c	0,0 b	0,0 b	0,0 d
2	1,0	0,0	0,0	100,0 a	0,0 c	0,0 b	0,0 b	0,0 d
3	2,0	0,0	0,0	76,0 b	0,0 c	0,0 b	0,0 b	0,0 d
4	0,0	0,5	0,0	0,0 d	9,80 b	1,78 b	0,06 b	3,98 d
5	0,0	1,0	0,0	0,0 d	12,90 b	2,73 b	0,14 b	3,78 d
6	0,0	2,0	0,0	0,0 d	19,70 a	6,92 a	9,03 a	26,67 c
7	0,0	0,0	0,5	2,5 d	15,80 a	2,65 b	3,50 b	35,39 b
8	0,0	0,0	1,0	2,0 d	20,0 a	2,95 b	0,59 b	35,25 b
9	0,0	0,0	2,0	40,4 c	18,0 a	3,24 b	5,90 a	45,53 a

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 5 - Indução de raízes em folhas de *H.suavceolens* cultivadas *in vitro* por 48 dias em meio MS semissólido suplementado com 2,4-D, AIB e ANA. T1 = 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D; T2 = 1 mg L⁻¹ de 2,4-D; T3= 2 mg L⁻¹ de 2,4-D; T4 = 0,5 mg L⁻¹ de AIB; T5 = 1 mg L⁻¹ de AIB; T6= 2,0 mg L⁻¹ de AIB; T7= 0,5 mg L⁻¹ de ANA; T8 = 1,0 mg L⁻¹ de ANA; T9=2 mg L⁻¹ de ANA.



Fonte: Da autora (2020).

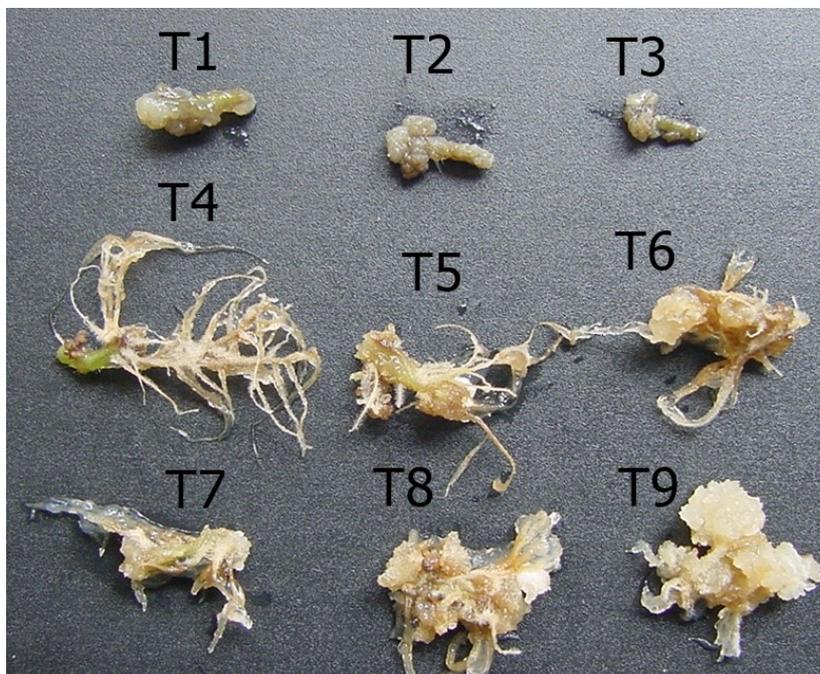
Tabela 7 - Porcentagem de calos (% Calos), número (NR), tamanho (TR) e matéria fresca (MFR) e seca (MSR) de raízes adventícias obtidas a partir de segmento nodal de *H. suaveolens* cultivados *in vitro* por 48 dias, em meio de cultura MS semissólido suplementado com diferentes concentrações de 2,4D, AIB e ANA.

Tratamentos Explante (Segmento Nodal)	2,4-D mg L ⁻¹	AIB mg L ⁻¹	ANA mg L ⁻¹	Cobertura de Calos (%)	NR	TR cm	MFR por frasco (g)	MSR (mg)
1	0,5	0,0	0,0	66,00 b	0,00 d	0,00 b	0,00 b	0,00 d
2	1,0	0,0	0,0	31,50 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b	0,00 d
3	2,0	0,0	0,0	20,00 d	0,00 d	0,00 b	0,00 b	0,00 d
4	0,0	0,5	0,0	16,00 d	10,40 b	2,54 a	2,08 a	37,62 a
5	0,0	1,0	0,0	49,00 c	17,30 a	2,34 a	2,63 a	27,55 b
6	0,0	2,0	0,0	90,00 a	14,40 b	2,13 a	0,64 b	28,52 b
7	0	0	0,5	79,00 b	7,50 c	1,89 a	0,35 b	16,86 c
8	0	0	1	100,00 a	19,60 a	2,02 a	0,47 b	0,00 d
9	0	0	2	90,00 a	12,90 b	1,97 a	0,27 b	0,00 d

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 6 - Indução de raízes em segmentos nodais de *H.suavceolens* cultivados *in vitro* por 48 dias, em meio MS semissólido suplementado com 2,4-D, AIB e ANA. T1 = 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D; T2 = 1 mg L⁻¹ de 2,4-D; T3= 2 mg L⁻¹ de 2,4-D; T4 = 0,5 mg L⁻¹ de AIB; T5 = 1 mg L⁻¹ de AIB; T6= 2,0 mg L⁻¹ de AIB; T7= 0,5 mg L⁻¹ de ANA; T8 = 1,0 mg L⁻¹ de ANA; T9=2 mg L⁻¹ de ANA.



Fonte: Da autora (2020).

O regulador de crescimento 2,4-D é a auxina mais empregada nos processos de calogênese. Ela estimula o início da divisão celular e atua controlando o crescimento por meio do aumento da produção de RNA polimerase, estimulando a produção de RNA e biossíntese de proteínas de crescimento. Assim, na presença de 2,4-D, as células do explante passam pelo processo de desdiferenciação, seguidas da divisão (PINTO *et al.*, 2016). Além disso, apresenta atividade na promoção do enraizamento lateral e na inibição do alongamento radicular (TOFANELLI; FREITAS; PEREIRA, 2014).

As concentrações de AIB e ANA (0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) induziram a formação de raízes adventícias em folhas de *H. suaveolens* (TABELA 6, FIGURA 5). O tratamento na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de ANA possibilitou a formação de maior matéria seca de raízes (MSR) (45,53 mg). Em segmentos nodais de *H. suaveolens*, as concentrações de AIB (0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e ANA (0,5 mg L⁻¹) também induziram a formação de raízes adventícias (TABELA 7, FIGURA 6). O tratamento 0,5 mg L⁻¹ de AIB possibilitou maior matéria seca de raízes (MSR) (37,62 mg). Os tratamentos contendo 1 e 2 mg L⁻¹ de ANA resultaram em baixa matéria seca de raízes (MSR) e alta porcentagem de calos (% calos) (100 e 90%, respectivamente).

Ácido naftaleno acético (ANA), em comparação com AIB, também foi mais eficiente na indução de raízes adventícias em explantes foliares da espécie *A. paniculata*. Da mesma forma, ANA mostrou-se mais adequado para a indução de raízes adventícias em *P. rosea*, *H. perforatum*, *B. diffusa*, *Al. vera* e *E. longifolia*. Além disso, combinações de auxinas também são consideradas vantajosas em comparação com o tratamento com auxina única para estimular raízes adventícias. Por outro lado, altas concentrações de auxinas retardam o crescimento e desenvolvimento de raízes, conforme relatado em *P. corylifolia* e *E. cretica* (AHMAD *et al.*, 2015).

Em relação à quantificação de PTOX (TABELA 8), a lignana encontrada nas raízes adventícias oriundas de folhas foi maior sob 1 mg L⁻¹ de AIB (9,96 µg g⁻¹ raiz). A PTOX encontrada nas raízes adventícias oriundas de segmento nodal foi maior sob os tratamentos 1 e 2 mg L⁻¹ de AIB (9,97 e 9,95 µg g⁻¹ raiz, respectivamente).

Tabela 8 - Podofilotoxina obtida em raízes adventícias originadas de folhas e segmentos nodais de *H. suaveolens* cultivados *in vitro* em meio MS semissólido com diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e ANA.

Tratamento	2,4-D (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	PTOX Folha (µg g ⁻¹ raiz)	PTOX Segmento nodal (µg g ⁻¹ raiz)
1	0,5	0,0	0,0	sem raiz	sem raiz
2	1,0	0,0	0,0	sem raiz	sem raiz
3	2,0	0,0	0,0	sem raiz	sem raiz
4	0,0	0,5	0,0	8,97 b	8,70 b
5	0,0	1,0	0,0	9,96 a	9,97 a
6	0,0	2,0	0,0	7,49 c	9,95 a
7	0,0	0,0	0,5	7,94 c	4,09 d
8	0,0	0,0	1,0	8,81 b	4,85 d
9	0,0	0,0	2,0	6,02 d	6,63 c

Fonte: Da autora (2020).

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÃO

Em folhas de *H. suaveolens* cultivadas em meio MS semissólido, apenas na ausência de luz e sob luz LED vermelha ocorreu formação de raízes adventícias. Para a maior obtenção de PTOX, indica-se o seu cultivo na ausência de luz. Para a indução de raízes adventícias em folhas de *H. suaveolens* em meio MS semissólido e produção de PTOX, na ausência de luz, o meio pode ser suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. No caso do explante utilizado ser segmento nodal, indica-se $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, N. *et al.* Effect of PGRs in adventitious root culture *in vitro*: presente scenario and future prospects. **Rendiconti Lincei**, Milano, v. 26, p. 307-321, 2015.
- CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B. S. de; CARDOSO, F. de C. I. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 2, p. 124-132, 2019.
- KISS, J. Z. *et al.* Phytochromes A and B mediate red light-induced positive phototropism in roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, n. 3, p. 1411-1417, Mar. 2003.
- LEGUÉ, V.; RIGAL, A.; BHALERAO, R. P. Adventitious root formation in tree species: involvement of transcription factors. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 151, n. 2, p. 192-198, 2014.
- LI, M. *et al.* High-elevation cultivation increases anti-cancer podophyllotoxin accumulation in *Podophyllum hexandrum*. **Industrial Crops and Products**, London, v. 121, p. 338-344, Dec. 2018.
- MIR, M. Y. *et al.* Effect of light and dark conditions on biomass accumulation and secondary metabolite production in suspension cultures of *artemisia amygdalina* decne. **Journal of Himalayan Ecology and Sustainable Development**, Srinagar, v. 12, p. 107-112, 2017.
- MONTEUUIS, O.; BON, M. C. Influence of auxins and darkness on *in vitro* rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, p. 173-177, 2000.
- MURTHY, H. N. *et al.* Biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. *In*: RAMAWAT, K.; EKIERT, H.; GOYAL, S. (ed.). **Plant cell and tissue differentiation and secondary metabolites**. Zürich: Springer, 2019. p. 1-17.
- NAVAS, J. S. *et al.* D-root: a system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. **The Plant Journal**, Oxford, v. 84, p. 244-255, 2015.
- PINTO, D. I. J. G. e C. *et al.* Efeito do 2,4-D na indução de calos em *Amburana cearenses* (Allemão) A.C.Smith. **Anais dos Seminários de Iniciação Científica**, Feira de Santana, n. 20, p. 2-5, 2016.
- SEEGERS, C. L. C.; SETROIKROMO, R.; QUAX, W. J. Towards metabolic engineering of Podophyllotoxin production. *In*: BADRIA, F. A. (ed.). **Natural products and cancer drug discovery**. London: IntechOpen, 2017. chap. 11.
- TOFANELLI, M. B. D.; FREITAS, P. L.; PEREIRA, G. E. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid as an alternative auxin for rooting of vine rootstock cuttings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 36, n. 3, p. 664-672, 2014.

VELÓZ, R.; CARDOSO-TAKETA, A.; VILLARREAL, M. Production of podophyllotoxin from roots and plantlets of *Hyptis suaveolens* cultivated in vitro. **Pharmacognosy Research**, Bangalore, v. 5, n. 2, p. 93-102, 2013.

YOUSEFZADI, M. *et al.* The effect of light on gene expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Linum álbum* cell culture. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 56, p. 41-46, 2012.