



ADRIANE DUARTE COELHO

**BIOACUMULAÇÃO DE PODOFILOTOXINA EM RAÍZES
in vitro E ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
Hyptis suaveolens (L.) Poit**

**LAVRAS - MG
2023**

ADRIANE DUARTE COELHO

**BIOACUMULAÇÃO DE PODOFILOTOXINA EM RAÍZES *in vitro*
E ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Hyptis suaveolens* (L.) Poit**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Manejo de Plantas Medicinais, para a obtenção do Título de Doutor.

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Coorientadora

Prof. Dr. Alexandre Alves de Carvalho
Coorientador

**LAVRAS - MG
2023**

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

Coelho, Adriane Duarte.

Bioacumulação de podofilotoxina em raízes *in vitro* e
isolamento de fungos endofíticos de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit /
Adriane Duarte Coelho. - 2023.

108 p.: il.

Orientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci, Alexandre
Alves de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Metabolismo secundário. 2. Cultivo in vitro. 3. Fungos
endofíticos. I. Pinto, José Eduardo. II. Bertolucci, Suzan Kelly
Vilela. III. de Carvalho, Alexandre. IV. Título.

ADRIANE DUARTE COELHO

**BIOACUMULAÇÃO DE PODOFILOTOXINA EM RAÍZES *in vitro*
E ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Hyptis suaveolens* (L.) Poit**

**PODOPHYLOTOXIN BIOACCUMULATION IN ROOTS *in vitro*
AND ISOLATION OF ENDOPHYTIC FUNGI FROM *Hyptis suaveolens* (L.) Poit**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Manejo de Plantas Medicinais, para a obtenção do Título de Doutor.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2023.

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA
Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci – UFLA
Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso – UFLA
Profa. Dra. Priscila Pereira Botrel – IF-Sudeste
Dra. Simony Carvalho Mendonça - UFRJ

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Coorientadora

Prof. Dr. Alexandre Alves de Carvalho
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antônio e Heloisa, por todo o apoio e amor incondicional em todas as fases e etapas da minha vida; Não poderia ser mais grata ao Universo por ter me colocado nas mãos de pessoas tão maravilhosas quanto vocês.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Agricultura (DAG) e Setor de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, em especial ao Laboratório de Cultura de Tecidos em Plantas Medicinais, Laboratório de Fitoquímica e ao Horto Medicinal, pela disponibilidade, estrutura e oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e Canadá, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Prof. José Eduardo, pela confiança, ensinamentos e carinho. Obrigada por me mostrar o quão as plantas são especiais, por apontar meus erros, acertos e me indicar a direção certa.

À Profa. Suzan, pela orientação, amizade e conselhos em todas as etapas que enfrentei para chegar até este momento. Serei sempre grata por todo o seu carinho, ensinamentos e apoio para que eu pudesse me tornar sempre minha melhor versão.

Ao Laboratório da Profa. Suzana Leitão, Profa. Ivana Leal e Dra. Simony da Central Analítica do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos (CA-DPNA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelas análises de UHPLC-UVMS-MS.

Ao Prof. Praveen Saxena, Dr. Mukund Shukla, GRIPP e University of Guelph, por todo apoio, novos conhecimentos e gentileza e durante minha estadia no Canadá.

Aos Profs. Wilson e Luciane, por me acolherem quando a tempestade parecia não passar, por todo o carinho, amizade e apoio que vocês me deram. Ao Prof. Gavilanes por sempre me fez sorrir em sua presença.

À Profa. Patrícia, por me apresentar ao mundo dos fungos e me abrir as portas para um universo tão intrigante; pela estrutura, conhecimento e recursos para a conclusão desta tese. Ao Prof. Alexandre por toda atenção e auxílio quando necessitei.

A todos os colegas de trabalho que viraram grandes amigos, em especial Julia, Ione, Barbara, João Pedro e Jeremias. Aos técnicos Evaldo, Annete, Dico, Paulinho (*in memoriam*) e Giulia, pelo carinho e por sempre estarem dispostos a ajudar em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos Lucas, Pedro Arthur e Ana Flávia que mesmo distantes, estamos sempre juntos. Em especial a minha segunda-mãe Andréa por ter me acompanhado desde o início dessa jornada e me apoiado a cada segundo em cada uma das minhas decisões, sem exceção.

Agradeço, em especial, ao meu avô Genuíno (*in memoriam*), por ser o responsável por toda a minha inquietação por viajar o mundo e conhecer a fundo a natureza desde criança, me inspirando com suas frases sobre a vida, em meio às nossas partidas de baralho e documentários científicos. Este título de Doutora em Ciências eu dedico a você e à pequena Dri.

RESUMO GERAL

Hyptis suaveolens contém podofilotoxina (PTOX) em suas raízes, lignana utilizada pela indústria farmacêutica na produção de medicamentos quimioterápicos. Metabólitos secundários de interesse econômico podem ser obtidos de forma sustentável via biotecnologia vegetal e fungos endofíticos. Desta forma, objetivou-se o estudo de elicitores na micropropagação e na cultura de raízes da *H. suaveolens* visando o aumento da biossíntese da PTOX, assim como a identificação de fungos endofíticos produtores de PTOX na espécie. Foram realizados três experimentos: 1) Segmentos apicais de *H. suaveolens* foram inoculados em meio MS contendo diferentes concentrações de serotonina ou melatonina (0; 0,25; 0,50; 1,00; 5,00 e 10,00 μM) e floroglucinol (0 e 50 mg/L). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (6 x 2). Após 40 dias, o crescimento *in vitro* e acúmulo de biomassa foram avaliados. PTOX foi caracterizada e quantificada nas raízes por UHPLC-UVMS/MS e HPLC-DAD. A suplementação com 0,5 μM melatonina e 50 mg/L de floroglucinol aumentou o enraizamento *in vitro*. O uso de 1,0 μM de melatonina ou serotonina associado ao floroglucinol aumentou produção de PTOX nas raízes da *H. suaveolens* em 2,07 e 1,61 vezes, respectivamente. A associação entre melatonina ou serotonina e floroglucinol favorece a produção de biomassa e biossíntese de PTOX nas raízes de *H. suaveolens* micropropagadas. 2) Raízes de plântulas de *H. suaveolens* (400 mg) foram cultivadas em erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura MS e diferentes elicitores: qualidade de luz, melatonina, serotonina, metil-jasmonato, ácido salicílico e quitosana. Utilizou-se o DIC, sendo um experimento para cada elicitor. Após 42 dias em shaker (100 r.p.m.), avaliou-se a matéria fresca e seca das raízes e a produção de PTOX nas raízes e no meio de cultura. Os melhores resultados quanto ao acúmulo de biomassa nas raízes foram observados nos tratamentos com LED azul, 50 mg/L de quitosana, 10 μM de melatonina, 30 μM de serotonina, 5 e 10 mM de metil-jasmonato e 25 mM de ácido salicílico. A produção de PTOX foi favorecida com uso de 100 mg/L de quitosana, 30 μM de melatonina, 10 μM de serotonina e 10 mM de metil-jasmonato. O uso de elicitores é indicado visando aumento da produção de biomassa e PTOX via cultura de raízes de *H. suaveolens*. 3) Fungos endofíticos foram isolados e cultivados em meio líquido BD por 30 dias (100 r.p.m.). Os fungos obtidos passaram por triagem com aplicação de extrato do micélio e sobrenadante em cromatografia em camada delgada (CCD) quanto à potencial produção de PTOX. Dos 21 fungos endofíticos isolados somente *Plectosphaerella cucumerina* foi identificado como produtor de PTOX, sendo confirmado por UHPLC-UVMS/MS e HPLC-DAD, produzindo 12,48 μg PTOX/L de meio de cultura BD. PTOX não foi encontrada no micélio. A espécie *P. cucumerina* encontrada na raiz da *H. suaveolens* produz e exuda PTOX para o meio de cultura.

Palavras-chave: *Plectosphaerella cucumerina*. *Mesosphaerum suaveolens*. Elicitores. Metabolismo secundário. Bamburral.

ABSTRACT

Hyptis suaveolens contains podophyllotoxin (PTOX) in its roots, a lignan used by the pharmaceutical industry in the production of chemotherapy drugs. Secondary metabolites of economic interest can be sustainably obtained via plant biotechnology and endophytic fungi. Thus, the objective was to study elicitors in micropropagation and in root culture of *H. suaveolens*, aiming at increasing PTOX biosynthesis, as well as identifying endophytic fungi that produce PTOX in the species. Three experiments were carried out: 1) Apical segments of *H. suaveolens* were inoculated in MS medium containing different concentrations of serotonin or melatonin (0; 0.25; 0.50; 1.00; 5.00 and 10.00 μM) and phloroglucinol (0 and 50 mg/L). After 40 days, *in vitro* growth and biomass accumulation were evaluated. The design was DIC in a factorial scheme (6 x 2). PTOX was characterized and quantified in the roots by UHPLC-UVMS/MS and HPLC-DAD. Supplementation with 0.5 μM melatonin and 50 mg/L of phloroglucinol increased *in vitro* rooting. The use of 1.0 μM of melatonin or serotonin associated with phloroglucinol increased PTOX production in the roots of *H. suaveolens* by 2.07 and 1.61 times, respectively. The association between melatonin or serotonin and phloroglucinol favors the production of biomass and PTOX biosynthesis in the micropropagated roots of *H. suaveolens*. 2) Roots of *H. suaveolens* seedlings (400 mg) were cultivated in flasks containing 50 mL of MS culture medium and different elicitors: light quality, melatonin, serotonin, methyl-jasmonate, salicylic acid and chitosan. DIC was used, with one experiment for each elicitor. After 42 days in a shaker (100 rpm) in the dark, the fresh and dry matter of the roots and the production of PTOX in the roots and in the culture medium were evaluated. The best results regarding the accumulation of biomass in the roots were observed in the treatments with blue LED, 50 mg/L of chitosan, 10 μM of melatonin, 30 μM of serotonin, 5 and 10 mM of methyl jasmonate and 25 mM of salicylic acid. The production of PTOX was favored with the use of 100 mg/L of chitosan, 30 μM of melatonin, 10 μM of serotonin and 10 mM of methyl jasmonate. The use of elicitors is indicated in order to increase the production of biomass and PTOX via *H. suaveolens* root culture. 3) Endophytic fungi were isolated and cultivated in BD liquid medium for 30 days (100 r.p.m.). The fungi obtained underwent screening with application of mycelium extract and supernatant in thin layer chromatography (TLC) for potential PTOX production. Of the 21 endophytic fungi isolated, only *Plectosphaerella cucumerina* was identified as a PTOX producer, being confirmed by UHPLC-UVMS/MS and HPLC-DAD, producing 12.48 μg PTOX/L of BD culture medium. PTOX was not found in the mycelium. The *P. cucumerina* species found in the root of *H. suaveolens* produces and exudes PTOX into the culture medium.

Keywords: *Plectosphaerella cucumerina*. *Mesosphaerum suaveolens*. Elicitors. Secondary metabolism. Bamburral.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 -	A espécie <i>Hyptis suaveolens</i> cultivada em vasos em casa-de-vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. A) Parte aérea; B) Folhas e flores (60 dias); C) Frutos e sementes em ponto de coleta (120 dias)	15
Figura 2 -	Locais de ocorrência da espécie <i>Hyptis suaveolens</i>	16
Figura 3 -	Estrutura bidimensional da podofilotoxina.....	20
Figura 4 -	Esquema da rota biossintética da podofilotoxina (PTOX).....	21
Figura 5 -	Transformação da molécula da podofilotoxina (PTOX) a derivados semi-sintéticos menos tóxicos utilizados em quimioterapias.....	22

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 1 -	Plântulas de <i>Hyptis suaveolens</i> L. oriundas de segmentos apicais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de melatonina em ausência e presença de floroglucinol no meio de cultura, aos 40 dias....	45
Figura 2 -	A) Matéria seca das folhas (MSF); B) caule (MSC); C) raiz (MSR); D) total (MST); E) parte aérea (MSPA); F) razão raiz/parte aérea (MSR:MSPA) de plântulas micropropagadas de <i>Hyptis suaveolens</i> oriundas de segmentos apicais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de serotonina e floroglucinol, aos 40 dias.....	47
Figura 3 -	Plântulas de <i>Hyptis suaveolens</i> L. oriundas de segmentos apicais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de serotonina em ausência e presença de floroglucinol no meio de cultura, aos 40 dias.....	49
Figura 4 -	A) Matéria seca das folhas (MSF); B) caule (MSC); C) raiz (MSR); D) total (MST); E) parte aérea (MSPA); F) razão raiz/parte aérea (MSR:MSPA) de plântulas micropropagadas de <i>Hyptis suaveolens</i> oriundas de segmentos apicais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de melatonina e floroglucinol, aos 40 dias.....	53
Figura 5 -	Cromatogramas de UHPLC-MS/MS (modo positivo) do padrão de PTOX para amostras de Floroglucinol 50 mg/L + Melatonina 1µM e Floroglucinol 50 mg/L + Serotonina 1µM.....	54
Figura 6 -	Espectro de MS/MS do íon de m/z 414.7 [M+H] ⁺	55
Figura 7 -	Perfis cromatográficos obtidos por HPLC-DAD de amostras representativas do experimento com melatonina (M) e serotonina (S). A: padrão de PTOX; B: Co-injeção da amostra com o padrão PTOX; C: amostra. Os espectros no UV foram obtidos <i>on-line</i> pelo detector DAD para a amostra e o padrão PTOX a 210 nm.....	56
Figura 8 -	Curvas analíticas e média das curvas obtidas por HPLC-DAD, em 3 dias consecutivos de avaliação do padrão podofilotoxina (PTOX) e condições do equipamento.....	57

ARTIGO 2

Figura 1 -	Raízes frescas de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> por 42 dias em diferentes regimes de luz (escuro, LED azul, vermelho e branco)	72
------------	--	----

Figura 2 -	Raízes frescas de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de quitosana (0, 50, 100 e 150 mg/L)	74
Figura 3 -	Raízes frescas de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> por 40 dias em diferentes concentrações de melatonina (0, 10, 30 e 100 µM)	76
Figura 4 -	Raízes frescas de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> por 40 dias em diferentes concentrações de serotonina (0, 10, 30 e 100 µM)	78
Figura 5 -	Raízes frescas de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de metil-jasmonato (0, 5, 10 e 20 mM)	80
Figura 6 -	Raízes frescas de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de ácido salicílico (0, 25, 50 e 100 mM)	82
Figura 7 -	Cromatogramas de UHPLC-MS/MS (modo positivo) do padrão de PTOX e dos tratamentos mais promissores com os elicitores: LED, Quitosana, Melatonina, Serotonina, Metil-jasmonato e Ácido salicílico nas amostras de raiz.....	84
Figura 8 -	Cromatogramas de UHPLC-MS/MS (modo positivo) do padrão de PTOX e dos tratamentos mais promissores com os elicitores: LED, Quitosana, Melatonina, e Serotonina nas amostras de meio de cultura...	85
Figura 9 -	Espectro de MS/MS do íon de m/z 414.7 [M+H] ⁺	86

ARTIGO 3

Figura 1 -	Fungos endofíticos da espécie <i>Hyptis suaveolens</i> cultivados em meio líquido BD por 30 dias.....	97
Figura 2 -	Processo de obtenção do extrato a partir do micélio dos fungos endofíticos encontrados na espécie <i>Hyptis suaveolens</i>	98
Figura 3 -	Análises por CCD para seleção dos fungos endofíticos de <i>Hyptis suaveolens</i> produtores de PTOX.....	99
Figura 4 -	Triagem dos extratos dos fungos endofíticos encontrados nas raízes de <i>Hyptis suaveolens</i> : A) Meio de cultura; B) Micélio.....	101
Figura 5 -	Fungo endofítico <i>Plectosphaerella cucumerina</i> identificado como produtor de podofilotoxina. A: Fungo cultivado em meio BDA após 20 dias; B: Fungo cultivado em BD líquido após 30 dias; C: Microscopia ótica do <i>P. cucumerina</i>	102
Figura 6 -	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do fungo endofítico <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	102
Figura 7 -	Perfil cromatográfico do meio de cultura de <i>Plectosphaerella cucumerina</i> obtido por HPLC-DAD. A: padrão de PTOX; B: Co-injeção da amostra com o padrão PTOX; C: amostra. Os espectros no UV foram obtidos <i>on-line</i> pelo detector DAD para a amostra e o padrão PTOX a 210 nm.	103
Figura 8 -	Cromatograma de UHPLC-MS/MS (modo positivo) do padrão de PTOX e da solução estéril de fungos.....	104
Figura 9 -	Espectro de MS/MS do íon de m/z 414.7 [M+H] ⁺	104

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1 -	Valores de altura da plântula (AP), número de folhas (NF), número de segmentos nodais (NSN), área foliar (AF), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR) e clorofilas totais (Chl) de plântulas micropropagadas de <i>Hyptis suaveolens</i> oriundas de segmentos apicais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de serotonina e floroglucinol, aos 40 dias.....	46
Tabela 2 -	Valores de altura da plântula (AP), número de folhas (NF), número de segmentos nodais (NSN), área foliar (AF), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR) e clorofilas totais (Chl) de plântulas micropropagadas de <i>Hyptis suaveolens</i> oriundas de segmentos apicais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de melatonina e floroglucinol, aos 40 dias.....	50
Tabela 3 -	Limites de quantificação e detecção determinados com base nos parâmetros das curvas analíticas obtidas pelas condições cromatográficas.....	57
Tabela 4 -	Quantificação de PTOX nas raízes adventícias obtidas a partir de segmentos apicais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de melatonina e floroglucinol, aos 40 dias.....	58
Tabela 5 -	Quantificação de PTOX nos tratamentos que possibilitaram obtenção de maior matéria seca de raízes adventícias obtidas a partir de segmentos apicais cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes concentrações de serotonina e floroglucinol, aos 40 dias.....	59

ARTIGO 2

Tabela 1 -	Matéria fresca (MFR _i) e seca (MSR _i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR _f) e seca (MSR _f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes qualidades de luz.....	72
Tabela 2 -	Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; µg/g), no meio de cultura (PTOX meio; µg/mL), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; µg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; µg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); µg) para a espécie <i>Hyptis suaveolens</i> em diferentes qualidades de luz, por 42 dias.....	73
Tabela 3 -	Matéria fresca (MFR _i) e seca (MSR _i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR _f) e seca (MSR _f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de quitosana.....	74
Tabela 4 -	Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; µg/g), no meio de cultura (PTOX meio; µg/mL), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; µg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; µg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); µg) para	

	a espécie <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de quitosana.....	75
Tabela 5 -	Matéria fresca (MFR _i) e seca (MSR _i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR _f) e seca (MSR _f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de melatonina.....	76
Tabela 6 -	Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; µg/g), no meio de cultura (PTOX meio; µg/mL), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; µg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; µg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); µg) para a espécie <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de melatonina.....	77
Tabela 7 -	Matéria fresca (MFR _i) e seca (MSR _i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR _f) e seca (MSR _f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de serotonina.....	78
Tabela 8 -	Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; µg/g), no meio de cultura (PTOX meio; µg/mL), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; µg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; µg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); µg) para a espécie <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de serotonina.....	79
Tabela 9 -	Matéria fresca (MFR _i) e seca (MSR _i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR _f) e seca (MSR _f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de metil-jasmonato.....	79
Tabela 10 -	Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; µg/g), no meio de cultura (PTOX meio; µg/mL), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; µg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; µg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); µg) para a espécie <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de metil-jasmonato.....	81
Tabela 11 -	Matéria fresca (MFR _i) e seca (MSR _i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR _f) e seca (MSR _f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas <i>in vitro</i> no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de ácido salicílico.....	81
Tabela 12 -	Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; µg/g), no meio de cultura (PTOX meio; µg/mL), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; µg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; µg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); µg) para a espécie <i>Hyptis suaveolens</i> cultivadas no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de ácido salicílico.....	83

ARTIGO 3

Tabela 1 -	Fungos endofíticos isolados nas raízes da espécie <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit (Primer utilizado: ITS)	100
------------	--	-----

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	13
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. Características agronômicas da espécie <i>Hyptis suaveolens</i>	14
2.2. Atividade biológica e aplicações da espécie.....	17
2.3. Podofilotoxina (PTOX).....	19
2.3.1. Produção <i>in vitro</i> de PTOX em <i>Hyptis suaveolens</i>	22
2.3.2. Uso de diferentes elicitores no acúmulo de podofilotoxina (PTOX)	23
2.3.3. Fungos endofíticos: biofábrica de metabólitos de interesse econômico.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
SEGUNDA PARTE	36
ARTIGO 1 - MELATONINA, SEROTONINA E FLOROGLUCINOL NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ACÚMULO DE PODOFILOTOXINA EM PLÂNTULAS DE <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) POIT <i>IN VITRO</i>.....	36
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. Material vegetal.....	40
2.2. Estabelecimento <i>in vitro</i>	40
2.3. Serotonina, melatonina e floroglucinol no crescimento e acúmulo de PTOX em raízes de <i>H. suaveolens</i> micropropagadas.....	41
2.4. Análise da matéria seca e crescimento <i>in vitro</i>	41
2.5. Análises cromatográficas da podofilotoxina (PTOX).....	42
2.5.1. Preparo de amostras.....	42
2.5.2. Caracterização por UHPLC-UVMS/MS e HPLC-DAD.....	42
2.5.3. Quantificação de PTOX por HPLC-DAD.....	43
2.6. Análise estatística dos dados.....	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1. Serotonina, melatonina e floroglucinol no crescimento de raízes de <i>H. suaveolens</i> micropropagadas	44
3.2. Serotonina, melatonina e floroglucinol no acúmulo de PTOX em raízes de <i>H. suaveolens</i> micropropagadas.....	54
4. CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
ARTIGO 2 - ELICITORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA CULTURA DE RAÍZES DE <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) POIT.....	65
1. INTRODUÇÃO.....	68
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1. Material vegetal.....	69
2.2. Condições gerais dos experimentos.....	69
2.3. Elicitores bióticos e abióticos no acúmulo de biomassa de raízes e produção de PTOX na cultura de raízes de <i>Hyptis suaveolens</i>	70
2.3.1. Qualidade de luz.....	70
2.3.2. Quitosana.....	70
2.3.3. Melatonina.....	70

2.3.4.	Serotonina.....	70
2.3.5.	Metil-jasmonato.....	71
2.3.6.	Ácido salicílico.....	71
2.4.	Análises de crescimento	71
2.4.1.	Acúmulo de biomassa nas raízes	71
2.4.2.	Índice de crescimento de matéria fresca e seca.....	71
2.5.	Análises de podofilotoxina (PTOX)	72
2.6.	Análise estatística dos dados.....	72
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
3.1.	Qualidade de luz.....	72
3.2.	Quitosana.....	74
3.3.	Melatonina.....	77
3.4.	Serotonina.....	79
3.5.	Metil-jasmonato.....	81
3.6.	Ácido salicílico.....	82
3.7.	Análises de UHPLC-MS/MS.....	84
4.	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88

**ARTIGO 3 – SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE
PODOFILOTOXINA EM RAÍZES DE *Hyptis suaveolens* (L.) POIT.....**

1.	INTRODUÇÃO.....	96
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	97
2.1.	Obtenção do material vegetal.....	97
2.2.	Desinfestação do material vegetal.....	97
2.3.	Isolamento dos fungos endofíticos.....	97
2.4.	Cultivo dos fungos.....	97
2.5.	Identificação dos fungos endofíticos.....	98
2.6.	Preparo do extrato para análises cromatográficas.....	98
2.6.1.	Micélio.....	98
2.6.2.	Meio de cultura (sobrenadante).....	99
2.7.	Seleção dos fungos produtores de PTOX por CCD.....	99
2.8.	Análises da podofilotoxina no extrato do fungo selecionado.....	100
2.9.	Análise dos dados.....	100
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
3.1.	Isolamento e identificação dos fungos endofíticos.....	101
3.2.	Triagem por cromatografia em camada delgada (CCD).....	102
3.3.	Identificação de podofilotoxina (PTOX) por HPLC-UV e UHPLC- MS/MS.....	104
4.	CONCLUSÃO.....	107
	REFERÊNCIAS.....	108

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO GERAL

A *Hyptis suaveolens* (L.) Poit é uma espécie aromática e medicinal utilizada no tratamento de inflamações, diarreia, gripe, infecções, reumatismo, dores de estômago e cólicas (RIBEIRO et al., 2017; HOSSAN et al., 2018; SHARMA et al., 2014). A espécie tem sido estudada por sua atividade bioherbicida, inseticida, repelente de insetos, fungicida, nematocida e bactericida (JAYA et al., 2011; PANDEY et al., 2012; AGBENIN, 2014; SONIBARE et al., 2015; ADJOU; CHOUGOUROU; SOUMANOU, 2019).

As raízes de *H. suaveolens* contém podofilotoxina (PTOX), uma lignana conhecida por suas propriedades antimitóticas, utilizada no tratamento de câncer e de verrugas genitais causadas pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) (VÉLOZ et al., 2013; KUMARI et al., 2017; DA SILVA et al., 2022). Segundo o Instituto Global Info Research (2021), o mercado mundial de produção de PTOX movimentou em 2021 aproximadamente 1 milhão de dólares em forma de reagente de alta pureza (95 e 98%) e como intermediário farmacêutico para produção dos seus derivados utilizados pela indústria farmacêutica.

Atualmente, ainda não existe um processo eficiente de obtenção sintética da PTOX e seus derivados comercializados como medicamentos para o tratamento do câncer (LAUTIE; VILLARREAL; FLINIAUX, 2008). Assim, a coleta de plantas para extração de PTOX tem reduzido drasticamente as populações de espécies do gênero *Podophyllum* (CHAUDHARI et al., 2014). Portanto, para satisfazer a demanda crescente de mercado é necessário desenvolver novos métodos sustentáveis de obtenção deste composto bioativo.

A produção de PTOX através de raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas em campo para diminuir a exploração de espécies em extinção poderia resultar num problema ambiental ainda maior, devido ao grande potencial invasor da espécie (RAIZADA, 2006). Assim, a cultura de tecidos de plantas medicinais pode ser empregada na produção de biomassa da *H. suaveolens* e seus metabólitos secundários, como a PTOX. Deste modo, seria uma alternativa mais segura do ponto de vista ambiental, pois a produção *in vitro* ocorre em ambiente controlado (LAUTIE; VILLARREAL; FLINIAUX, 2008). Além disso, outra alternativa é a extração de PTOX a partir de fungos endofíticos, isolados de espécies que produzem este metabólito secundário (LIANG et al., 2016).

O uso de elicitores é uma estratégia utilizada por pesquisadores para melhorar a produção de compostos secundários de importância comercial nas plantas medicinais (SINGH;

DWIVEDI, 2018). Na literatura, existem relatos de bioacumulação da PTOX utilizando ácido salicílico em *Linum album* e *Juniperus virginiana* (YOUSEFZADI et al., 2010; KAŠPAROVÁ et al., 2018), metil-jasmonato *L. album* e *Podophyllum peltatum* (FÜRDEN et al., 2005; ANBAZHAGAN et al., 2008), diferentes qualidades de luz em *Hyptis suaveolens* e *L. album* (YOUSEFZADI et al., 2012; DA SILVA et al., 2022), quitosana em *L. album* (SEDIGHEH et al., 2012; SEDIGHEH et al., 2013) e uso de extrato de fungos (KUMARI et al., 2017).

Além disso, outros compostos químicos também podem ser adicionados no meio de cultura para aumentar o acúmulo de biomassa de raízes, como as indolaminas melatonina e serotonina, e o floroglucinol, utilizados na micropropagação de plantas medicinais como reguladores de crescimento (ERLAND et al., 2015).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo o cultivo *in vitro* de raízes de *Hyptis suaveolens* visando a produção de biomassa, utilizando elicitores bióticos e abióticos na indução de PTOX, assim como isolar e caracterizar espécies de fungos endofíticos produtores de PTOX na *H. suaveolens*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Características agronômicas da espécie *Hyptis suaveolens*

O gênero *Hyptis* pertence à família Lamiaceae juntamente com outros gêneros de importância medicinal e econômica, como *Mentha*, *Lavandula*, *Ocimum*, *Thymus*, *Salvia*, *Origanum* e *Rosmarinus* (URITU et al., 2018). As espécies pertencentes a esta família botânica são conhecidas por sua atividade antibacteriana e antioxidante (SILVA et al., 2017; LIMA et al., 2017). Das espécies mais estudadas do gênero *Hyptis*, estão *H. conferta*, *H. dilatata*, *H. mutabilis* e *H. suaveolens*.

Hyptis suaveolens, conhecida popularmente como “bamburral” e “cheirosa”, é uma espécie medicinal e aromática que se apresenta como um subarbusto, ereto, ramificado, podendo atingir até 2 metros de altura (FIGURA 1). Seu caule e ramos são quadrangulados e as folhas são opostas e aromáticas, podendo apresentar a lâmina de formato oval com margem serrada. As inflorescências são do tipo paucifloras com flores arroxeadas-azuladas. O fruto é considerado do tipo esquizocárpico. As folhas da *H. suaveolens* apresentam tricomas glandulares e não-glandulares, dispersos nas nervuras, face adaxial e abaxial (RAIZADA, 2006; CHATRI et al., 2018).

Figura 1 - A espécie *Hyptis suaveolens* cultivada em vasos em casa-de-vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. A) Parte aérea; B) Folhas e flores (60 dias); C) Frutos e sementes em ponto de coleta (120 dias).

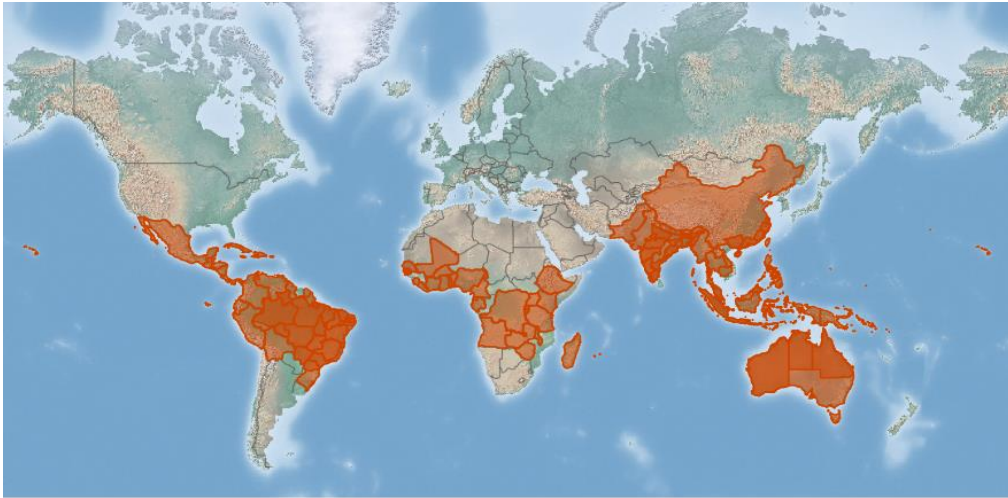


Fonte: Da autora (2023).

A espécie apresenta como sinónimas *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze, *Ballota suaveolens* L., *Bystropogon graveolens* Blume, *Gnoteris cordata* Raf., *Gnoteris villosa* Raf., *Hyptis congesta* Leonard, *Hyptis graveolens* Schrank, *Hyptis plumieri* Poit., *Marrubium indicum* Blanco, *Schaueria graveolens* (Blume) Hassk. e *Schaueria suaveolens* (L.) Hassk. (THE PLANTLIST, 2021).

Hyptis suaveolens é considerada uma planta invasora e pode ser encontrada em vários países do mundo, com maior concentração em regiões tropicais úmidas, mas também ocorrendo em ambientes subtropicais e semi-áridos (RAIZADA, 2006) (FIGURA 2). Além disso, a *H. suaveolens* apresenta efeito alelopático, impedindo a germinação de sementes de plantas concorrentes, podendo espalhar por uma região e diminuir a biodiversidade antes ali presente, tendo maior sucesso em épocas quentes e chuvosas quando comparado com o inverno (AFREEN et al., 2018; KUMARI; PRASAD, 2018). Sua reprodução pode ser realizada tanto por cruzamento ou endogamia, em casos nos quais o ambiente dificulta a reprodução da espécie (SHARMA; SHARMA, 2019).

Figura 2 - Locais de ocorrência da espécie *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.



Fonte: Invasive Species Compendium - CAB International (2022).

A espécie pode ser propagada por sementes ou estacas, chegando a 86% de enraizamento de estacas de 5 a 10 cm advindas de ramos herbáceos (MAIA et al., 2008; DA SILVA et al., 2011). Plantas de *Hyptis suaveolens* cultivadas em casa-de-vegetação, florescem após 104 a 118 dias após a emergência, apresentando maior acúmulo de matéria seca total em 145 dias, seguido da senescência das plantas (GRAVENA et al., 2002). Lopes e Jardim (2008) reportaram o florescimento da espécie na região de Belém de março a agosto, seguido da frutificação no mês de dezembro.

A espécie tem preferência por adubação orgânica e mineral, apresentando melhores resultados de crescimento ao se utilizar esterco de aves como fertilizante, promovendo aumento também no teor de óleo essencial (MAIA et al., 2008; DE MESQUITA ARRUDA, 2018). Estresse salino e hídrico reduziu o crescimento das plantas e provocou acúmulo de Na^+ nas raízes de *H. suaveolens* (DE MESQUITA ARRUDA, 2018).

Suas sementes possuem alto poder de germinação podendo germinar em ambientes com ou sem luminosidade. Entretanto, em condições de temperatura de 25 a 30 °C, suas sementes apresentam alta porcentagem de germinação (90,5%). Entretanto, suas sementes tem a capacidade de germinar de 10 a 40 °C. Ao entrar em contato com a água, a semente libera mucilagem de característica gelatinosa, servindo de reservatório de água para a semente como estratégia de sobrevivência e em condições favoráveis, uma planta pode liberar mais de 2000 sementes por metro quadrado (RAIZADA, 2006).

Em relação à micropropagação da espécie, segmentos nodais e apicais cultivados em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) apresentaram melhores resultados

quanto ao crescimento e desenvolvimento das plântulas sob lâmpadas LED brancas e nas combinações de vermelho (V) e azul (A), nas proporções 4V:10A e 10V:4A (ANDRADE et al., 2015).

2.2. Atividade biológica e aplicações da espécie

Na medicina popular, toda a planta é utilizada na forma de infusão e decocção para o tratamento de diarreia, reumatismo, inflamações, febre, infecções, gripe e insônia (RIBEIRO et al., 2017). Suas sementes são empregadas no tratamento da gonorreia, dores de cabeça e febre em Bangladesh (HOSSAN et al., 2018). O extrato aquoso das folhas é utilizado no tratamento de dores de estômago, cólicas e machucados (SHENOY; PATIL; KUMAR, 2009). O extrato aquoso das folhas também inibiu a atividade das enzimas CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4 e CYP2B6 (THOMFORD et al., 2018; THOMFORD et al., 2016), indicando a necessidade de atenção especial ao administrar medicamentos concomitante com o uso da espécie. Além disso, segundo Sumitha e Thoppil (2016), a *H. suaveolens* apresenta citotoxicidade.

Estudos reportaram atividade inseticida da espécie e aplicação no controle de insetos-praga na agricultura (ADJOU; CHOUGOUROU; SOUMANOU, 2019; JAYA; PRAKASH; DUBEY, 2014). A mistura de 150 µL de óleo essencial de *H. suaveolens* em cada grama de pó de caulinita foi capaz de inibir 100% o nascimento e emergência dos adultos de *Callosobruchus maculatus* (KEITA et al., 2000). A aplicação semanal do extrato aquoso preparado com folhas da espécie inibiu o desenvolvimento de larvas de *Sesamia calamistis* em grãos de milho (*Zea mays*) (ADDA et al., 2011). A aplicação de 0,5 µl do óleo essencial obtido de folhas de *H. suaveolens* foi aplicado no armazenamento de grãos de amendoins (0,5 µl OE/grama de grão) causou 100% de mortalidade após 24h e 100% de repelência em *Tenebroides mauritanicus*, sendo considerada como repelente de classe V (alta atividade repelente). Os autores atribuíram a atividade inseticida ao monoterpeneo 1,8-cineol, componente majoritário do óleo essencial (ADJOU; CHOUGOUROU; SOUMANOU, 2019).

No sudoeste da Nigéria, planta-se tradicionalmente a espécie ao redor das casas como repelente de insetos (SONIBARE et al., 2015). Vongsombath et al. (2012) ao avaliarem soluções de 5, 10 e 19% de óleo essencial solubilizado em etanol 95% concluíram que o óleo essencial de *Hyptis suaveolens* repele espécies de mosquitos do gênero *Armigeres* (nas concentrações de 10 e 19%) e *Culex* (5 e 19%). O óleo essencial obtido das folhas frescas de *H. suaveolens* apresentou atividade larvicida e repelente contra o mosquito *Aedes albopictus* Skuse, transmissor da dengue, zika e chikungunya (CONTI et al., 2012; YADAV et al., 2015).

Dentre os compostos identificados, o terpinoleno foi considerado o responsável pela atividade inseticida do óleo essencial (CONTI et al., 2012). O extrato metanólico das folhas da espécie foi eficaz no controle de *Culex quinquefasciatus*, reduzindo a densidade das larvas do mosquito em até 93%, 72 horas após o tratamento, com dose letal (DL₅₀) de 86,93 ppm de extrato (KOVENDAN et al., 2012).

Estudos indicam a *Hyptis suaveolens* como potencial candidata para identificação e isolamento de aleloquímicos para desenvolvimento de bioherbicidas. Kumari e Prasad (2018) ao estudarem o efeito alelopático das *H. suaveolens* concluíram que a espécie inibe a germinação das espécies *Parthenium hysterophorus* e *Senna uniflora*. De acordo com Islam; Kato-Nogushi (2013), o extrato metanólico obtido das raízes e da parte aérea na concentração de 100 mg em equivalente de matéria seca por mL de solvente inibiu significativamente a germinação de capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*).

O óleo essencial obtido das folhas de *Hyptis suaveolens* também possui atividade antimicrobiana para bactérias gram-positivas e gram-negativas. O estudo realizado Joy, Omanakutty e Mathew (2008) indicou sensibilidade das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* ao óleo essencial da espécie, em uma concentração mínima inibitória (CMI) variando de 1,56 a 6,25 µL/mL. O extrato etanólico (70%) de folhas da espécie inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* Meti-R e *Pseudomonas aeruginosa* ceft/Imp-R (GOLY et al., 2015). Seu óleo essencial inibiu completamente o crescimento das bactérias *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas putida*, com MIC de 2,0 e 8,0 µL/mL, respectivamente. Neste estudo, a CMI do antibiótico estreptomicina (controle positivo) foi de 8,0 µL/mL para *E. herbicola*, constatando a atividade antimicrobiana da *H. suaveolens* no controle desta bactéria patogênica (PANDEY et al., 2012).

Sharma e Tripathi (2008) ao avaliarem o potencial fungitóxico do óleo essencial da *Hyptis suaveolens* no armazenamento de cormos de flores corte do gênero *Gladiolus* constataram que 0,6 µL/cm do óleo essencial da espécie inibiu completamente o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, ao passo que a concentração de 0,4 µL/cm inibiu a germinação dos conídios. Segundo Jaya e Dubey (2014), a aplicação do óleo essencial por fumigação exibiu uma proteção contra fungos de mais de 80% em amostras de trigo em armazenamento.

Na literatura existem poucos relatos da utilização da espécie como alimento. A sua parte aérea é rica em minerais como potássio, cálcio, magnésio, nitrogênio, sódio e fósforo (NGOZI et al., 2014). Polissacarídeos e oligossacarídeos neutros encontrados nas sementes da espécie possuem potencial prebiótico, além de ricas em globulinas, gluteínas, albuminas e prolaminas

(AGUIRRE et al., 2012; MULLER et al., 2017). A mucilagem presente nas sementes tem sido estudada para aplicação na indústria alimentícia, sendo indicada como gelificante e agente estabilizante (PRAZNIK et al., 2017; PÉREZ-OROZCO et al., 2019).

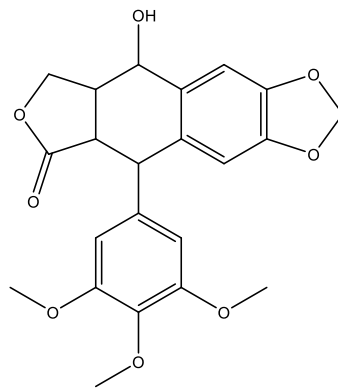
Pesquisas relatam a presença de PTOX nas raízes de *Hyptis suaveolens* (VÉLOZ et al., 2013; DA SILVA et al., 2022). A PTOX é conhecida por suas propriedades de combate ao câncer e no tratamento de verrugas genitais causadas pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) (KUMARI et al., 2017; NCBA, 2019).

2.3. Podofilotoxina (PTOX)

A podofilotoxina (PTOX) (FIGURA 3) é uma lignana aril-tetralina biosintetizada pela via dos fenilpropanóides, iniciando-se com a L-fenilalanina, a qual é convertida ao ácido cinâmico pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL). Posteriormente, o ácido cinâmico passa por diversas transformações até se formar uma molécula de podofilotoxina (BHATTACHARYYA et al., 2012) (FIGURA 4). As lignanas aril-tetralina são reconhecidas por sua atividade anti-câncer e antiviral (CHAITRAMALLU; DEVARAJU, 2014). A principal forma de obtenção desta lignana é via extração em rizomas em plantas do gênero *Podophyllum*, com destaque para a espécie *P. hexandrum*, a qual apresenta maior concentração de PTOX nas suas raízes (até 4,3%) em comparação com outras espécies (KUMAR et al., 2015).

Devido à sua alta toxicidade, a PTOX isolada não é empregada diretamente como droga anti-câncer. Entretanto, seus derivados semi-sintéticos etoposídeos, fosfato de etoposídeo e teniposídeos são comercializados como medicamentos para o tratamento do câncer, devido a sua atividade antimitótica, inibindo o crescimento das células pela inibição da tubulina ou inibindo a enzima DNA topoisomerase II (YOU, 2005; LAUTIÉ; FLINIAUX; VILLARREAL, 2008; SHAH et al., 2021).

Figura 3 - Estrutura bidimensional da molécula da podofilotoxina.

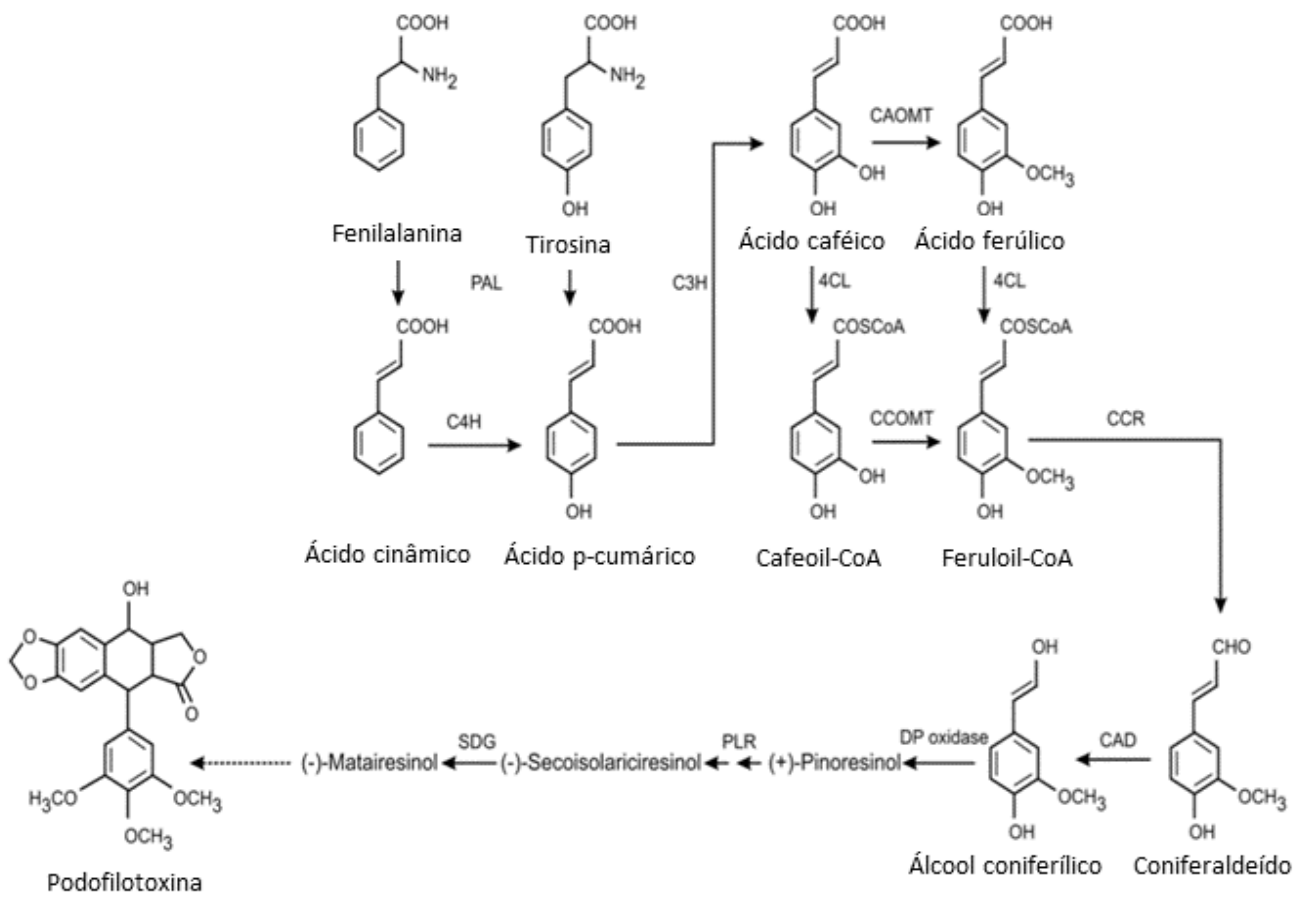


Fonte: NPASS (2023).

A promissora atividade de seus derivados levou à criação de novos produtos semissintéticos menos tóxicos, como o NK611, GL-311, TOP-53 e Azatoxina, sendo este último considerado a mais potente (FIGURA 5) (QIAN LIU; YANG; TIAN, 2007). Estes compostos são utilizados no tratamento de câncer de pulmão, testículos e cervical, assim como em casos de leucemia (KAMAL et al., 2015).

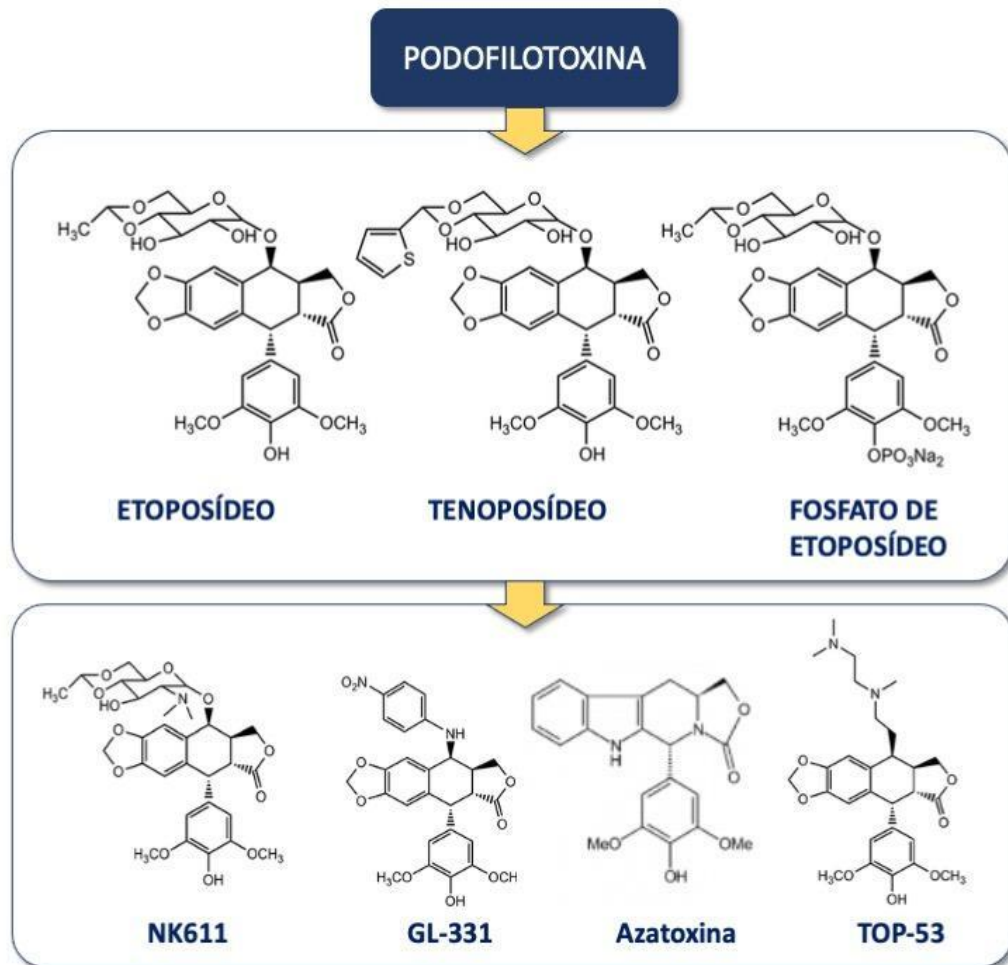
Atualmente, não existe um processo de obtenção sintético eficiente de produção da PTOX e seus derivados (BAZALDÚA et al., 2019). Para tal, a coleta de plantas do gênero *Podophyllum* para extração de PTOX está levando espécies à extinção (CHAUDHARI et al., 2014). Portanto, novas formas de obtenção dessa substância se mostram necessárias e, assim, a biotecnologia de *Hyptis suaveolens* surgiu como alternativa sustentável para a obtenção da podofilotoxina (LAUTIÉ; VILLARREAL; FLINIAUX, 2008).

Figura 4 – Esquema da rota biossintética da podofilotoxina (PTOX)



Fonte: Adaptado de Bhattacharyya et al. (2012).

Figura 5 – Transformação da molécula da podofilotoxina (PTOX) a derivados semi-sintéticos menos tóxicos utilizados em quimioterapias.



Fonte: Adaptado de Shah et al. (2021).

2.3.1. Produção *in vitro* de PTOX em *Hyptis suaveolens*

A síntese química de PTOX é um processo caro e a utilização da cultura de tecidos vegetais surgiu como uma alternativa com custo-benefício viável (SEDIGHEH et al., 2013). A expressão de PTOX em *Hyptis suaveolens* ocorre tanto na parte aérea quanto no sistema radicular das plantas, mas com maior acúmulo nas raízes (TANG et al., 2019). Além disso, essa maior expressão de PTOX nas raízes também ocorre nas raízes das plântulas *in vitro* de *H. suaveolens*. Culturas de raízes de *H. suaveolens* em meio líquido sem a utilização de reguladores de crescimento atingiram maior produção de PTOX do que calos sob efeitos de diferentes reguladores de crescimento (VÉLOZ et al., 2013). Da Silva et al. (2022) também

identificaram PTOX em raízes adventícias advindas de folhas de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* sob LED vermelho e no escuro.

A produção de PTOX pode ser aumentada por transformação genética. Bazaldúa et al. (2019) conseguiram aumentar a produção de PTOX em *H. suaveolens* pelo método de indução *in vitro* de *hairy roots* por cepas K599+pGus-GFP+ e ATCC15834+pTDT de *Agrobacterium rhizogenes*. Nesse experimento, o aumento de produção foi 100 vezes maior em relação a raiz da planta selvagem e 56 vezes maior em relação a raízes *in vitro* de plantas não transformadas. Outra forma que tem sido estudada visando a otimização da produção da PTOX é a adição de elicitores bióticos e abióticos na composição do meio de cultura a ser utilizado no cultivo *in vitro*.

2.3.2. Uso de diferentes elicitores no acúmulo da podofilotoxina (PTOX)

Uma das formas de aumentar a expressão de PTOX é utilizar ácido salicílico (AS). O uso de AS triplicou a expressão PTOX em cultura de células em suspensão de *Linum album*, pela ativação dos genes PAL, CCR e CAD (YOUSEFZADI et al., 2010). O aumento da expressão de PTOX pela estimulação com AS também foi observada em células em suspensão de *Juniperus virginiana* (KAŠPAROVÁ et al., 2018). O ácido salicílico é conhecido como um fitohormônio secundário e elicitor da expressão de metabólitos secundários ligados a resistência sistêmica contra vários patógenos (SINGH; DWIVEDI, 2018).

O metiljasmonato (MeJA) também foi identificado como indutor da expressão de PTOX. A concentração de PTOX dobrou em cultura de células em suspensão de *Linum album*, de 2 a 5 horas após a adição de MeJA (FÜRDEN et al., 2005). A produção de PTOX também aumentou em culturas *in vitro* de células embriogênicas e de raízes adventícias de *Podophyllum peltatum* (ANBAZHAGAN et al., 2008). Mais recentemente, observou-se que o mecanismo de indução de PTOX por MeJA, em *Podophyllum hexandrum*, envolveu a indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais estimularam significativamente a produção de PTOX. Conclui-se que as ROS ativam a expressão de genes responsáveis pela biossíntese de PTOX (HAZRA et al., 2017).

A quitosana, conhecida como um elicitor biótico de metabólitos secundários em plantas, também foi eficiente no aumento da produção *in vitro* de PTOX. O tratamento de culturas celulares de *Linum album* com quitosana dobrou a produção de PTOX em relação ao tratamento controle (SEDIGHEH et al., 2012). Em estudos mais recentes, observou-se que esse aumento de produção de PTOX em *L. album* está relacionado ao aumento da expressão de genes

relacionados à via de biossíntese de fenilpropanóides (SEDIGHEH et al., 2013) e genes PAL, CCR e CAD, lignanas e neolignanas (AHMAD et al., 2019).

A qualidade de luz interfere na produção de PTOX. Da Silva et al (2022), ao quantificarem a PTOX em raízes adventícias advindas de folhas de *Hyptis suaveolens* cultivadas no escuro e sob luz LED vermelha monocromática, reportaram 10,72 µg/g e 9,93 µg/g do metabólito secundário, respectivamente. A luz vermelha aumentou a produção de PTOX em *Linum album* com aumento da atividade das enzimas PAL e com aumento de expressão de genes envolvidos na biossíntese de PTOX, como PAL e CCR. A luz azul também aumentou a produção de PTOX associada a maior expressão dos genes CCR e PLR em *L. album* (YOUSEFZADI et al., 2012).

O uso de extratos de fungos também se mostrou promissor no aumento da produção de PTOX. O emprego de 3 % (v/v) do meio de cultura filtrado do fungo *Piriformospora indica* aumentou a produção de PTOX em 3,8 vezes, em comparação ao tratamento controle, resultando em 233,8 mg/L de PTOX em *hairy roots* de *Linum album*, após 48 h de exposição (KUMAR et al., 2012).

Não há estudos na literatura disponível avaliando o efeito do uso das indolaminas melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) no acúmulo *in vitro* de PTOX. Entretanto, calos de *Ocimum basilicum* L. var *purpurascens* tratados com 1 mg/L de melatonina acumularam 1,4 vezes mais ácido rosmarínico que o controle. O uso de 2 mg/L promoveu a biossíntese de ácido chicórico e antocianinas (cianida e peonidina) na espécie supracitada. Já a elicitação com 4 mg/L de melatonina em associação com 20 min de exposição a UV-C aumentou o acúmulo de ácido caféico em 1,9 vezes (NAZIR et al., 2020). Além disso, a adição de 100 µM de melatonina aumentou o acúmulo de ácido rosmarínico em calos de *Ocimum basilicum* em quase 5 vezes (754,2 µg/g), em comparação com o grupo controle (DURAN; KILIC; COSKUN, 2019). A suplementação com 20 µM de melatonina no meio de cultura MS triplicou a produção de metabólitos secundários em calos de *Lepidium sativum* L., dentre eles o ácido clorogênico, canferol e quercetina. Além disso, 20 µM de melatonina promoveu aumento nas atividades antioxidantes e antidiabéticas, com atividade máxima das enzimas α -glicosidase (57,84%) e α -amilase (62,66%) (ULLAH et al., 2019). Ptak et al. (2019) reportaram maior produção do alcaloide galantamina (46,88 µg/L) em plântulas de *Leucojum aestivum* cultivadas *in vitro* com suplementação de melatonina no meio de cultura (5 µM), sendo 58,6 vezes superior ao controle (0,88 µg/L). Além disso, maior acúmulo de licorina foi observado nos tratamentos contendo 5 e 10 µM do elicitor (113 e 116 µg/L, respectivamente). Além disso, estes elicitores vem sendo estudados por serem capazes de promover o crescimento vegetal, principalmente indicados na

promoção de enraizamento e acúmulo de biomassa de raiz e parte aérea, sendo considerados como mediadores na morfogênese nos vegetais (MURCH et al., 2001; MURCH; SAXENA, 2002; ERLAND et al., 2017). De acordo com Erland e colaboradores (2016), as indolaminas são derivadas do triptofano e desempenham seu papel em diversas vias metabólicas, influenciando diretamente a morfogênese das plantas e seu metabolismo secundário.

Também não foram encontrados relatos na literatura reportando o efeito do uso da serotonina (5-hidroxitriptamina) no acúmulo *in vitro* de PTOX. Derivada do triptofano, a serotonina pode influenciar no crescimento das raízes e parte aérea, além de aumentar a rigidez da parede celular das plantas, aumentando a tolerância ao ataque de patógenos (MURCH; SAXENA, 2002).

Floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno), também conhecido como floroglucina é um composto fenólico, isolado de plantas, algas marinhas ou microorganismos, utilizado pela indústria cosmética, têxtil, farmacêutica e na produção de explosivos (DA SILVA; DOBRÁNSZKI; ROSS, 2013). Na agricultura, é utilizado no processo de criopreservação de sementes (GALDIANO et al., 2012).

Na cultura de tecidos vegetais, o floroglucinol pode ser utilizado para reduzir a hiperhidricidade e aumentar a lignina nas plântulas *in vitro*, por ser um precursor da via de biossintética das ligninas (ROSS; GRASSO, 2010; ROSS; CASTILLO, 2010; DA SILVA; DOBRÁNSZKI; ROSS, 2013). Além disso, estudos sugerem seu uso na micropropagação de plantas devido ao efeito sinérgico quando utilizado juntamente com auxinas, sendo indicado em casos de necessidade de obter melhores índices de enraizamento *in vitro* de espécies de difícil propagação (TCHOUGA et al., 2020; LERIN et al., 2021).

A eficiência do floroglucinol na melhora do enraizamento *in vitro* de espécies medicinais tem sido relatada na literatura. A combinação de ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de 50 ou 100 μM com floroglucinol (30 μM) aumentou significativamente o número de raízes de *Cariniana legalis* cultivadas *in vitro*, espécie medicinal de difícil enraizamento, encontrada na Mata Atlântica Brasileira (LERIN et al., 2021). Já o uso do meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 396,5 mM de floroglucinol e 14,2 mM de AIB promoveu o enraizamento de 79% dos segmentos nodais de *Diospyros crassiflora* cultivados *in vitro*, sendo indicado pelos autores como o primeiro relato de sucesso de micropropagação da espécie (TCHOUGA et al., 2020).

Gómez-Pedraza et al. (2019) observaram que o uso de floroglucinol aumentou significativamente o número de raízes por plântulas de *Cosmos atrosanguineus*, de 11,1 para 24,2 raízes por plântula. O maior número de raízes foi observado ao utilizar 15 μM de AIB e

30 μM de floroglucinol na micropropagação de *Ansellia africana* (BHATTACHARYYA; KUMARI; VAN STADEN, 2018). Entretanto, na literatura a concentração de floroglucinol utilizada é bastante variada, sendo necessário o desenvolvimento de um protocolo para cada espécie (BHATTACHARYYA; KUMARI; VAN STADEN, 2018; TCHOUGA et al., 2020; LERIN et al., 2021).

2.3.3. Fungos endofíticos: biofábrica de metabólitos de interesse econômico

Uma das formas de obtenção de metabólitos secundários, como a podofilotoxina, é pela extração no micélio seco de fungos endofíticos, muitas vezes capazes de produzir os mesmos metabólitos que as plantas hospedeiras (HUANG et al., 2014). A descoberta de fungos endofíticos como fonte de PTOX pode trazer grande impacto na produção de drogas derivadas da PTOX, uma vez que podem ser produzidos em grande escala (scale-up) nas indústrias farmacêuticas.

Estudos evidenciam a extração de PTOX em fungos endofíticos isolados de algumas espécies vegetais. A espécie *Mucor fragilis*, isolada no rizoma da espécie *Sinopodophyllum hexandrum* encontrada nas montanhas Taibai na China, produziu 49,3 μg de PTOX por grama de micélio seco após 7 dias de fermentação em meio de cultura (HUANG et al., 2014). O fungo *Fusarium oxysporum*, isolado em *Juniperus recurva*, produziu 28 $\mu\text{g/L}$ de PTOX após 4 dias de fermentação (KOUR et al., 2008). Já o fungo *Fusarium solani*, isolado das raízes de *Podophyllum hexandrum* produziu em média 29,0 μg de PTOX por grama de micélio seco (MOHAMMAD et al., 2012). O fungo *Phialocephala fortinii*, obtido dos rizomas da espécie *Podophyllum peltatum*, produziu 189 $\mu\text{gPTOX/L}$ após 4 semanas em meio de cultura (EYEBERGER; DONDAPATI; PORTER, 2006).

REFERÊNCIAS

- ADDA, C.; ATACHI, P.; HELL, K.; TAMÒ, M. Potential use of the bushmint, *Hyptis suaveolens*, for the control of infestation by the pink stalk borer, *Sesamia calamistis* on maize in Southern Benin, West Africa. **Journal of Insect Science**, v. 11, n. 1, p. 33, 2011.
- ADIL, M.; ABBASI, B.H.; KHAN, T. Interactive effects of melatonin and light on growth parameters and biochemical markers in adventitious roots of *Withania somnifera* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, n. 2, p. 405-412, 2015.
- 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 fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v.14, p. 25-30, 2019.
- AFREEN, T.; SRIVASTAVA, P.; SINGH, H.; SINGH, J.S. Effect of invasion by *Hyptis suaveolens* on plant diversity and selected soil properties of a constructed tropical grassland. **Journal of Plant Ecology**, v. 11, n. 5, p. 751-760, 2018.
- AGBENIN, N. O. Effect of aqueous extract of some plants on soil micro-fauna and micro-flora in vitro. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 47, 205-211, 2014.
- AGUIRRE, C.; TORRES, I.; HERNÁNDEZ, G. M.; GASCA, T. G.; LABRA, A. B. Analysis of protein fractions and some minerals presente in chan (*Hyptis suaveolens* L.) seeds. **Journal of food Science**, n.1, v. 77, p. c15-c19, 2012.
- AHMAD, W.; ZAHIR, A.; NADEEM, M.; GARROS, L.; DROUET, S.; RENOUEAU, S.; DOUSSOT, J.; GUIVARC'H, N. G.; HANO, C.; ABBASI, B. H. Enhanced production of lignans and neolignans in chitosan-treated flax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures. **Process Biochemistry**, n. 1, v. 79, p. 155-165, 2019.
- ANBAZHAGAN, V. R.; AHN, C. H.; HARADA, E.; KIM, Y. S.; CHOI, Y. E. Podophyllotoxin production via cell and adventitious root cultures of *Podophyllum peltatum*. **In Vitro Cellular & Dvelopmental Biology – Plant**, n. 6, v. 44, p. 494-501, 2008.
- ANDRADE, H.B.; BRAGA, A.F.; BERTOLUCCI, S.K.V.; HSIE, B.S.; SILVA, S.T.; PINTO, J.E.B.P. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in vitro plantlets. In: **VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants** 1155, p. 277-284, 2015.
- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Growth activity, rooting capacity, and tropism: three auxinic precepts fulfilled by melatonin. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 6, p. 1-9, 2017.
- BAZALDÚA, C.; TAKETA, A. C.; TAPIA, G. T.; DIAZ, B. C.; ARELLANO, J.; ZAPATA, E. V.; VILLARREAL, M. L. Improving the production of podophyllotoxin in hair roots of *Hyptis suaveolens* induced from regenerates plantlets. **PLoS ONE**, n. 14, v. 9, p. 1-20, 2019.

BHATTACHARYYA, D.; SINHA, R.; GHANTA, S.; CHAKRABORTY, A.; HAZRA, S.; CHATTOPADHYAY, S. Proteins differentially expressed in elicited cell suspension culture of *Podophyllum hexandrum* with enhanced podophyllotoxin content. **Proteome science**, v. 10, n. 1, 34, 2012.

BHATTACHARYYA, P.; KUMAR, V.; VAN STADEN, J. In vitro encapsulation based short term storage and assessment of genetic homogeneity in regenerated *Ansellia africana* (Leopard orchid) using gene targeted molecular markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 133, n. 2, p. 299-310, 2018.

CHAITRAMALLU, M.; DEVARAJU, P. Synthesis of organic nanoparticle of aryl tetralin compounds and study of their biological activities for targeted delivery system. **Indian Journal of Advances in Chemical Science**, v. 2, p. 61-63, 2014.

CHATRI, M.; BAKTIAR, A.; MANSYURDIN, M.; PERIADNADI, P. Leaf trichomes morphology of *Hyptis suaveolens* (L.) poit. (Lamiaceae). In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, p. 012020, 2018.

CHAUDHARI, S. K.; BIBI, Y.; ARSHAD, M. *Podophyllum hexandrum*: na endangered medicinal plant from Pakistan. **Pure and Applied Biology**, n. 3, v.1, p. 19-24, 2014.

CONTI, B.; BENELLI, G.; FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; PROFETI, R.; CECCARINI, L.; MACCHIA, M.; CANALE, A. Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 2013-2021, 2012.

DA SILVA, A.C.; MAIA, S.S.S.; COELHO, M.D.F.B.; DE PAIVA, E.P.; DE MEDEIROS CUNHA, C.S. Comprimento de estacas na propagação vegetativa de bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.). **Revista Caatinga**, v. 24, n. 4, p. 191-194, 2011.

DA SILVA, J.A.T; DOBRÁNSZKI, J; ROSS, S. Phloroglucinol in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, p. 1-16, 2013.

DA SILVA, S.T.; COELHO, A.D.; DE ASSIS, R.M.A.; DE CARVALHO, A.A.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P. Influence of light quality and some growth regulators in inducing the production of Podophyllotoxin, a bioactive compound against cancer, in adventitious roots formed in the leaves of *Hyptis suaveolens*. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115710, 2022.

DE MESQUITA ARRUDA, M. V.; OLIVEIRA, F. F. M.; SAMPAIO, M. V.; DA SILVA FERNANDES, M. D. S.; DA SILVA DIAS, N.; DE ALBUQUERQUE, C. C.; DOS SANTOS FERNANDES, C. Influence of nutrition and water stress in *Hyptis suaveolens*. **Industrial crops and products**, v. 125, p. 511-519, 2018.

DURAN, R. E.; KILIC, S.; COSKUN, Y. Melatonin influence on in vitro callus induction and phenolic compound production in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, p. 468-475, 2019.

ERLAND, L. A.; MURCH, S. J.; REITER, R. J.; SAXENA, P. K. A new balancing act: The many roles of melatonin and serotonin in plant growth and development. **Plant signaling & behavior**, v. 10, n.11, e1096469, 2015.

ERLAND, L.A.E.; SAXENA, P. K.; MURCH, S. J. Melatonin in plant signalling and behaviour. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 2, p. 58-69, 2017.

ERLAND, L.A.; CHATTOPADHYAY, A.; JONES, A.M.P.; SAXENA, P.K. Melatonin in plants and plant culture systems: Variability, stability and efficient quantification. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1721, 2016.

ERLAND, L.A.E.; SAXENA, P. K. Melatonin in plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 1, p. 3-24, 2018.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal of natural products**, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, 2006.

FÜRDEN, B. V.; HUMBURG, A.; FUSS, E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, n. 24, v. 1, p. 312-317, 2005.

GALDIANO, R.F.; LEMOS, E.G.M.; FARIA, R.T.; VENDRAME, W.A. Cryopreservation of Dendrobium hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. **Scientia Horticulturae**, v.148, p. 154–160, 2012.

GLOBAL INFO RESEARCH - Podophyllotoxin Disponível em: <<https://marketpublishers.com/members/globalinfo/info.html>>. Acesso em 02 de outubro de 2022.

GOLY, K. R. C.; SORO, Y.; DADIE, A.; KASSI, A. B. B.; DJE, M. Antibacterial activity of essential oils and extracts from the leaves of *Hyptis suaveolens* and *Lippia multiflora* on multi-resistant bacteria. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 8, n.1, p. 396-403, 2015.

GÓMEZ-PEDRAZA, D.E.; MEJÍA-MUÑOZ, J.M.; MARTÍNEZ-SOLÍS, J.; MORALES-VÁZQUEZ, B. Morphogenetic variation in the multiplication and rooting in vitro of wild clones of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*). In: **XIII International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials 1237**, p. 243-250, 2019.

GRAVENA, R.; PEDRINHO JÚNIOR, A.F.F.; BARBOSA JÚNIOR, A.F.; BIANCO, S.; PITELLI, R.A. Análise do crescimento de *Hyptis suaveolens*. **Planta Daninha**, v. 20, p. 189-196, 2002.

HAZRA, S.; BHATTACHARYYA, D.; CHATTOPADHYAY, S. Methyl Jasmonate Regulates Podophyllotoxin Accumulation in *Podophyllum hexandrum* by Altering the ROS-Responsive Podophyllotoxin Pathway Gene Expression Additionally through the Down Regulation of Few Interfering miRNAs. **Front Plant Science**, n. 1, v. 8, p. 164-172, 2017.

HERNANDEZ-RUIZ, J.; CANO, A.; ARNAO, M. B. Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. **Planta**, v. 220, n. 1, p. 140-144, 2004.

HOSSAN, M. S.; JINDAL, H.; MAISHA, S.; RAJU, C. S.; SEKARAN, S.; NISSAPATORN, V.; KAHARUDIN, F.; YI, L. S.; KHOO, T. J.; RAHMATULLAH, M.;

WIART, C. Antibacterial effects of 18 medicinal plants used by the Khyang tribe in Bangladesh. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n.1, p. 201-208, 2018.

HUANG, J.X.; ZHANG, J.; ZHANG, X.R.; ZHANG, K.; ZHANG, X.; HE, X.R. *Mucor fragilis* as a novel source of the key pharmaceutical agents podophyllotoxin and kaempferol. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 10, p. 1237-1243, 2014.

ISLAM, A. K. M.; KATO-NOGUCHI, H. Allelopathic potential of five labiatae plant species on barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n.1, p. 1369-1374, 2013.

JAYA, B. P.; DUBEY, N. K. Evaluation of chemically characterised essential oils of *Coleus aromaticus*, *Hyptis suaveolens*, and *Ageratum conyzoides* against storage fungi and aflatoxin contamination of food commodities. **International Journal of Food Science & Technology**, n. 4, v. 46, p. 754-760, 2011.

JAYA, P. S.; PRAKASH, B.; DUBEY, N. K. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L., *Coleus aromaticus* benth. and *Hyptis suaveolens* (L.) poit essential oils as fumigant against storage grain insect tribolium castaneum herbst. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2210-2215, 2014.

JOY, B.; OMANAKUTTY, M.; MATHEW, M. Antibacterial effects and chemical composition of the essential oil of *Hyptis suaveolens* Poit Leaves. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 11, n. 4, p.384-390, 2008.

KAMAL, A.; ALI HUSSAINI, S.M.; RAHIM, A.; RIYAZ, S. Podophyllotoxin derivatives: A patent review (2012–2014). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 25, n. 9, p. 1025-1034, 2015.

KAŠPAROVÁ, M.; PILAŘOVÁ, P.; TŮMOVÁ, L.; SIATKA, T. Effect of Precursor and Phytohormones on Podophyllotoxin Production in *Juniperus virginiana* Suspension Cultures. **Natural Product Communications**, n. 11, v. 13, p. 1527-1529, 2018.

KÉÏTA, S.M.; VINCENT, C.; SCHMIT, J.P.; RAMASWAMY, S.; BÉLANGER, A. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of stored products Research**, v. 36, n. 4, p. 355-364, 2000.

KOUR, A.; SHAWL, A.S.; REHMAN, S.; SULTAN, P.; QAZI, P.H.; SUDEN, P.; KHAJURIA, R.K.; VERMA, V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1115-1121, 2008.

KOVENDAN, K.; MURUGAN, K.; PANNEERSELVAM, C.; KUMAR, P. M.; AMERASAN, D.; SUBRAMANIAM, J.; BARNARD, D. R. Laboratory and field evaluation of medicinal plant extracts against filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 110, n. 6, 2105-2115, 2012.

KUMAR, V.; RAJAURIA, G.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. Culture filtrate of root endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes the growth and lignan production of *Linum album* hairy root cultures. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 901-907, 2012.

- KUMAR, P.; PAL, T.; SHARMA, N.; KUMAR, V.; SOOD, H; CHAUHAN, R. S. Expression analysis of biosynthetic pathway genes vis-à-vis podophyllotoxin content in *Podophyllum hexandrum* Royle. **Protoplasma**, v. 252, 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**, n. 6, v. 37, p. 73-753, 2017.
- 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**, n. 3, v. 9, p. 290-298, 2018.
- LAUTIÉ, E.; VILLARREAL, M. L.; FLINIAUX, M. A. *Hyptis suaveolens*, an alternative source of podophyllotoxin? **Planta Medica**, n. 9, v. 74, p. 1106-1115, 2008.
- LERIN, J.; RIBEIRO, Y.R.D.S.; DE OLIVEIRA, T.D.R.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. Histomorphology and proteomics during rooting of in vitro shoots in *Cariniana legalis* (Lecythidaceae), a difficult-to-root endangered species from the Brazilian Atlantic Forest. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 144, n. 2, p. 325-344, 2021.
- LIANG, Z.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; LI, J.; ZHANG, X.; ZHAO, C. Endophytic fungus from *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying that produces Podophyllotoxin. **Journal of chromatographic science**, v. 54, n. 2, p. 175-178, 2016.
- LOPES, I.L.M.; JARDIM, M.A.G. Fenologia, biologia floral e germinação de plantas aromáticas: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) e *Mansoa standleyi* (Steyerm.) AH Gentry (Bignoniaceae) **Museu Paraense Emilio Goeldi**. 2008.
- MAIA, S.S.; PINTO, J.E.; DA SILVA, F.N.; DE OLIVEIRA, C. Enraizamento de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) em função da posição da estaca no ramo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 3, n. 4, p. 317-320, 2008.
- MAIA, S.S.S.; PINTO, J.E.B.P.; SILVA, F.N.; OLIVEIRA, C. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo do bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 3, n. 4, p. 327-331, 2008.
- MOHAMMAD, Nadeem et al. *Fusarium solani*, P1, a new endophytic podophyllotoxin producing fungus from roots of *Podophyllum hexandrum*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 10, p. 2493-2499, 2012.
- MULLER, M.; ČAVARKAPA, A.; UNGER, F. M.; VIERNSTEIN, H.; PRAZNIK, W. Prebiotic potential of neutral oligo- and polysaccharides from seed mucilage of *Hyptis suaveolens*. **Food Chemistry**, n.1, v. 221, p. 508-514, 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n. 3, 473-497, 1962.

MURCH, S. J.; CAMPBELL, S.S.B; SAXENA, P. K. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 6, p. 786-793, 2001.

MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Melatonin: a potential regulator of plant growth and development? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 6, p. 531-536, 2002.

MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Role of indoleamines in regulation of morphogenesis in in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). In: **XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants 629**. p. 425-432, 2002.

NATURAL PRODUCT ACTIVITY & SPECIES SOURCE DATABASE (NPASS).
Disponível em: <<https://bidd.group/NPASS/compound.php?compoundID=NPC10635>>.
Acesso em 11 de abril de 2023.

NAZIR, M.; ASAD ULLAH, M.; MUMTAZ, S.; SIDDIQUAH, A.; SHAH, M.; DROUET, S.; ABBASI, B. H. Interactive effect of melatonin and UV-C on phenylpropanoid metabolite production and antioxidant potential in callus cultures of purple basil (*Ocimum basilicum* L. var *purpurascens*). **Molecules**, v. 25, n. 5, 1072, 2020.

NGOZI, L. U.; UGOCHUKWU, N.; IFEOMA, P. U.; CHARITY, E. A.; CHINYELU, I. E. The efficacy of *Hyptis suaveolens*: A Review of its nutritional and medicinal applications. **European Journal of Medicinal Plants**, n. 6, v. 4, p. 661-674, 2014.

PTAK, A.; SIMLAT, M.; MORÁŃSKA, E.; SKRZYPEK, E.; WARCHOŁ, M.; TARAKEMEH, A.; LAURAIN-MATTAR, D. Exogenous melatonin stimulated Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis in in vitro cultures of *Leucojum aestivum* L. **Industrial Crops and Products** v. 138, n. 111458, 2019.

PANDEY, A. K.; SINGH, P.; PALNI, U.T.; TRIPATHI, N. N. In vitro antibacterial activities of the essential oils of aromatic plants against *Erwinia herbicola* (Lohnis) and *Pseudomonas putida* (Kris Hamilton). **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 3, p. 313-323, 2012.

PELAGIO-FLORES, Ramón et al. Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 3, p. 490-508, 2011.

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**, v. 87, p. 297-306, 2019.

PRAZNIK, W.; ČAVARKAPA, A.; UNGER, F. M.; LOEPPERT, R.; HOLZER, W.; VIERNSTEIN, H.; MUELLER, M. Molecular dimensions and structural features of neutral polysaccharides from the seed mucilage of *Hyptis suaveolens* L. **Food chemistry**, v. 221, p. 1997-2004, 2017.

QIAN LIU, Y.; YANG, L.; TIAN, X. Podophyllotoxin: current perspectives. **Current Bioactive Compounds**, v. 3, n.1, p. 37-66, 2007.

RAIZADA, P. Ecological and vegetative characteristics of a potent invader, *Hyptis suaveolens* Poit. from India. **Lyonia a jornal of ecology and application**, n. 11, v. 2, p. 115 – 120, 2006.

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. D. O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, n. 1, p. 69-102, 2017.

ROSS, S.; CASTILLO, A. Micropropagación de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. en medios de cultivo líquidos. **Agrociencia XIV**, n. 1, p. 1–7, 2010.

ROSS, S.; GRASSO, R. In vitro propagation of ‘Guayabo del país’ (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret). **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology** (special issue 1), p.83–87, 2010.

SEDIGHEH, E. B.; MOZAFAR, S.; NASER, S.; MEHRDAD, B. Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* culture. **Iranian Journal of Plant Biolog**, n. 11, v. 4, p. 13-25, 2012.

SEDIGHEH, E. B.; MOZAFAR, S.; NASER, S.; MEHRDAD, B. Increased the genes expression of phenylpropanoid biosynthesis pathway and production of podophyllotoxin by chitosan in cell cultures of *Linum album*. **Journal of Biotechnology**, n. 1, v. 4, p. 57-64, 2013.

SHAH, Z.; GOHAR, U.F.; JAMSHED, I.; MUSHTAQ, A.; MUKHTAR, H.; ZIA-UI-HAQ, M.; TOMA, S.I.; MANEA, R.; MOGA, M.; POPOVICI, B. Podophyllotoxin: history, recent advances and future prospects. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p.603, 2021.

SHARMA, J.; GAIROLA, S.; SHARMA, Y. P.; GAUR, R. D. Ethnomedicinal plants used to treat skin diseases by Tharu community of district Udham Singh Nagar, Uttarakhand, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.158, n.1, p.140-206, 2014.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Integrated management of postharvest Fusarium rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, n.1, p. 246-254, 2008.

SHARMA, P.; SHARMA, N. Mating strategies in a ruderal weed: case history of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **Vegetos**, v. 32, n. 4, p. 564-570, 2019.

SHENOY, C.; PATIL, M. B.; KUMAR, R. Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 3, p. 737-744, 2009.

SINGH, A.; DWIVEDI, P. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, n. 7, v. 1, p. 750-757, 2018.

SONIBARE, M. A.; OKORIE, P. N.; AREMU, T. O.; ADEGOKE, A. Ethno-medicines for mosquito transmitted diseases from South-western nigeria. **Journal of Natural Remedies**, v.15, n. 1, p. 33-42, 2015.

SUMITHA, K. V.; THOPPIL, J. E. Genotoxicity assessment of two common curing weeds: *Hyptis suaveolens* (L.) Poir. and *Leucas indica* (L.) R. Br. *Cytotechnology* v. 68, n.1, p. 1513-1527, 2016.

TANG, G.; LIU, X.; GONG, X.; LIN, X.; LAI, X.; WANG, D.; JI, S. Studies on the chemical compositions of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **Journal of Serbian Chemical Society**, n. 84, v. 3, p. 245–252, 2019.

TCHOUGA, A.O.; DEBLAUWE, V.; DJABOU, S.A.M.; FORGIONE, G.; HANNA, R.; NIEMENAK, N. Micropropagation and effect of phloroglucinol on rooting of *Diospyros crassiflora* Hiern. **HortScience**, v. 55, n. 4, p. 424-428, 2020.

THE PLANT LIST. Disponível em: < <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-102170>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2021.

THOMFORD, N. E.; AWORTWE, C.; DZOBO, K.; ADU, F.; CHOPERA, D.; WONKAM, A.; DANDARA, C. Inhibition of CYP2B6 by medicinal plant extracts: implication for use of efavirenz and nevirapine-based highly active anti-retroviral therapy (HAART) in resource-limited settings. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 211, 2016.

THOMFORD, N. E.; DZOBO, K.; ADU, F.; SHADRECK, C.; WONKAM, A.; DANDARA, C. Bush mint (*Hyptis suaveolens*) and spreading hogweed (*Boerhavia diffusa*) medicinal plant extracts differentially affect activities of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 1, v. 211, p. 58-69, 2018.

ULLAH, M. A.; TUNGMUNNITHUM, D.; GARROS, L.; DROUET, S.; HANO, C.; ABBASI, B. H. Effect of ultraviolet-C radiation and melatonin stress on biosynthesis of antioxidant and antidiabetic metabolites produced in in vitro callus cultures of *Lepidium sativum* L. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 7, 1787, 2019.

URITU, C.M.; MIHAI, C.T.; STANCIU, G.D.; DODI, G.; ALEXA-STRATULAT, T.; LUCA, A.; LEON-CONSTANTIN, M.M.; STEFANESCU, R.; BILD, V.; MELNIC, S.; TAMBA, B.I. Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. **Pain Research and Management**, v. 2018, 2018.

VÉLOZ, R. A.; TAKETA, A. C.; VILLARREAL, M. L. production of podophyllotoxin from roots and plantlets of *Hyptis suaveolens* cultivated *in vitro*. **Pharmacognos Research**, n. 5, v. 2, p. 93-102, 2013.

VONGSOMBATH, C., PLSSON, K.; BJRK, L.; BORG-KARLSON, A. K.; JAENSON, T. G. T. Mosquito (Diptera: Culicidae) repellency field tests of essential oils from plants traditionally used in Laos. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n.1, p. 1398-1404, 2012.

YADAV, R.; TIKAR, S. N.; SHARMA, A. K.; TYAGI, V.; SUKUMARAN, D.; JAIN, A. K.; VEER, V. Screening of some weeds for larvicidal activity against *Aedes albopictus*, A

vector of dengue and chikungunya. **Journal of Vector Borne Diseases**, v.52, n.1, 88-94, 2015.

YOU, Y. Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents. **Current pharmaceutical design**, v. 11, n. 13, p. 1695-1717, 2005.

YOUSEFZADI, M.; SHARIFI, M.; BEHMANESH, M.; GHASEMPOUR, A.; MOANO, E.; PALOZON, J. The effect of light on gene expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Linum album* cell culture. **Plant Physiology and Biochemistry**, N. 1, V. 56, P. 41-46, 2012.

YOUSEFZADI, M.; SHARIFI, M.; BEHMANESH, M.; GHASEMPOUR, A.; MOYANO, E.; PALAZON, J. Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis. **Biotechnology Letters**, v. 32, n.1, p. 1739-1743, 2010.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - MELATONINA, SEROTONINA E FLOROGLUCINOL NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ACÚMULO DE PODOFILOTOXINA EM PLÂNTULAS DE *Hyptis suaveolens* (L.) Poit *IN VITRO*

ARTICLE 1 - MELATONIN, SEROTONIN AND PHLOROGLUCINOL ON BIOMASS PRODUCTION AND PODOPHYLOTOXIN ACCUMULATION IN PLANTLETS OF *Hyptis suaveolens* (L.) Poit *IN VITRO*

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

RESUMO

Raízes de *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) contém podofilotoxina (PTOX), lignana utilizada como matéria-prima na produção de medicamentos para o tratamento do câncer. A cultura de tecidos permite o estudo da influência de elicitores na morfologia e no metabolismo secundário de plantas medicinais *in vitro*. Desta forma, objetivou-se avaliar o uso de diferentes concentrações de serotonina, melatonina e floroglucinol na micropropagação e no acúmulo de podofilotoxina (PTOX) nas raízes de *H. suaveolens in vitro*. Segmentos apicais foram inoculados na vertical em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS com diferentes concentrações de serotonina ou melatonina e floroglucinol. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (6x2), sendo 6 concentrações de melatonina ou serotonina (0; 0,25; 0,50; 1,00; 5,00 e 10,0 μM) e 2 concentrações de floroglucinol (0 e 50 mg/L). Os tubos foram encaminhados para a sala de crescimento ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) sob lâmpadas fluorescentes branca fria e fotoperíodo de 16h. Após 40 dias, o crescimento *in vitro*, matéria seca das folhas, caule e raiz foram avaliados e a PTOX foi caracterizada e quantificada nas raízes por UHPLC-UVMS/MS e HPLC-DAD. O enraizamento das plantas e biomassa seca da raiz foi beneficiado pelo uso de melatonina, sendo indicado o uso de 0,5 μM associado a 50 mg/L de floroglucinol. Os melhores resultados foram observados nos tratamentos contendo floroglucinol, exceto para o acúmulo de clorofila nas folhas. A suplementação com serotonina promoveu acúmulo da biomassa e comprimento das raízes, maior número de raízes e área foliar. A associação entre melatonina ou serotonina e 50 mg/L de floroglucinol favorece a produção de biomassa. O uso de 1,0 μM de melatonina ou serotonina associado a 50 mg/L de floroglucinol aumenta a produção de PTOX nas raízes da *H. suaveolens* em 2,07 e 1,61 vezes, respectivamente.

Palavras-chave: Planta medicinal. Serotonina. Melatonina. Metabolismo secundário. Bamburral.

ABSTRACT

Roots of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) contain podophyllotoxin (PTOX), a lignan used as a raw material in the production of drugs for the treatment of cancer. Tissue culture allows the study of the influence of elicitors on the morphology and secondary metabolism of medicinal plants *in vitro*. Thus, the objective was to evaluate the use of different concentrations of serotonin, melatonin and phloroglucinol in the micropropagation and accumulation of podophyllotoxin (PTOX) in the roots of *H. suaveolens in vitro*. Apical segments were vertically inoculated into test tubes containing MS culture medium with different concentrations of serotonin or melatonin. A completely randomized experimental design was used, in a factorial scheme (6x2), with 6 concentrations of melatonin or serotonin (0; 0.25; 0.50; 1.00; 5.00 and 10.0 μM) and 2 concentrations of phloroglucinol (0 and 50 mg/L). The tubes were sent to the growth room ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) under cold white fluorescent lamps and a 16h photoperiod. After 40 days, *in vitro* growth, leaf, stem and root dry matter were evaluated and PTOX was characterized and quantified in roots by UHPLC-UVMS/MS and HPLC-DAD. The rooting of the plants and dry biomass of the root was benefited by the use of melatonin, being indicated the use of 0.5 μM associated with 50 mg/L of phloroglucinol. The best results were observed in the treatments containing phloroglucinol, except for the accumulation of chlorophyll in the leaves. Serotonin supplementation was effective in promoting biomass accumulation and root length, root number and leaf area. The association between melatonin or serotonin and phloroglucinol favors the production of biomass. The use of 1.0 μM of melatonin or serotonin associated with 50 mg/L of phloroglucinol increases the production of PTOX in the roots of *H. suaveolens* by 2.07 and 1.61 times, respectively.

Keywords: Medicinal plant. Serotonin. Melatonin. Secondary metabolites. Bamburral.

1. INTRODUÇÃO

Hyptis suaveolens (L.) Poit (sinonímia: *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze) é uma espécie aromática e medicinal tradicionalmente utilizada no tratamento de inflamações, diarreia, gripe, infecções, reumatismo, dores de estômago e cólicas (SHARMA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2017; HOSSAN et al., 2018). Estudos indicam que suas raízes contêm podofilotoxina (PTOX), lignana utilizada pela indústria farmacêutica na produção de medicamentos para tratamento de verrugas genitais (VELOZ et al., 2013; Da SILVA et al., 2022). A molécula de PTOX apresenta atividade anticâncer, sendo transformada em derivados semissintéticos etoposídeos, fosfato de etoposido e teniposídeos, utilizados na fabricação de medicamentos empregados em quimioterapias (QIAN LIU; YANG; TIAN, 2007; KAMAL et al., 2015).

Atualmente, não há um processo eficiente para a biossíntese sintética da PTOX e seus derivados, sendo a mesma produzida a partir da coleta de raízes de populações do gênero *Podophyllum*, levando algumas espécies ao risco de extinção (LAUTIÉ; VILLARREAL; FLINIAUX, 2008; BAZALDÚA et al., 2019). Portanto, para satisfazer a demanda crescente do mercado torna-se necessário desenvolver novos métodos sustentáveis para a obtenção deste composto bioativo. Neste contexto, o cultivo *in vitro* de *Hyptis suaveolens* pode ser realizado para obtenção de biomassa de raízes e extração de PTOX, sendo também uma alternativa mais segura do ponto de vista ambiental (LAUTIÉ; VILLARREAL; FLINIAUX, 2008; DA SILVA et al., 2022). Além disso, a *Hyptis suaveolens* não deve ser cultivada fora de um ambiente controlado por se tratar de uma planta invasora de grande produção de sementes com alto poder de germinação e efeito alelopático que inibe a germinação de sementes de outras espécies, podendo se espalhar por toda região e diminuir a biodiversidade antes ali presente (AFREEN et al., 2018; KUMARI; PRASAD, 2018).

A micropropagação é uma técnica da cultura de tecidos vegetais que permite a propagação vegetativa de plantas medicinais com características desejadas, na qual o protocolo de cultivo *in vitro* influencia diretamente no crescimento e na produção de metabólitos secundários de interesse medicinal (COELHO et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2021; ROCHA et al., 2022). No entanto, um protocolo de micropropagação, deve ser desenvolvido para cada espécie, mas até o momento, existem poucos estudos sobre a o cultivo *in vitro* de *Hyptis suaveolens* e a produção de PTOX em suas raízes (ANDRADE et al., 2015; DA SILVA et al., 2022).

As indolaminas, serotonina (5-hidroxitriptamina) e melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), e o composto fenólico floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno) têm sido utilizados no cultivo *in vitro* de plantas medicinais, sendo considerados promotores de crescimento e estimulantes do enraizamento *in vitro* (MURCH; SAXENA, 2002; ERLAND et al., 2016; ARNAO; HERNANDEZ-RUIZ, 2017; TCHOUGA et al., 2020; LERIN et al., 2021). Ao influenciar no crescimento *in vitro* das raízes, as indolaminas e floroglucinol podem também atuar nas diferentes rotas metabólicas das plantas medicinais, podendo aumentar ou diminuir a produção de metabólitos secundários de interesse (PTAK et al., 2019; NAZIR et al., 2020). Entretanto, até o momento não há estudos disponíveis na literatura avaliando a respostas destes compostos no crescimento *in vitro* e na produção de PTOX em *Hyptis suaveolens*. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de diferentes concentrações de serotonina, melatonina e floroglucinol na micropropagação e no acúmulo de PTOX nas raízes de *H. suaveolens in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Sementes de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit foram obtidas de plantas-matrizes cultivadas em casa-de-vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade de Lavras (UFLA), em Minas Gerais, Brasil. As exsiccatas foram depositadas no Herbário ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da UFLA), sob o registro 20475 e Herbário SPF (Herbário da Universidade de São Paulo) com nome de coleta H.B. Andrade 1 (SPF).

2.2. Estabelecimento *in vitro*

Sementes de *Hyptis suaveolens* passaram pela etapa de retirada da mucilagem, utilizando-se cal virgem (2 g) em 50 mL de água destilada, sob agitação constante, por 5 min. Posteriormente, as sementes foram imersas em solução de 50% hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo) por 15 min, sob agitação constante, seguido de tríplice lavagem em água destilada autoclavada.

As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos sais, suplementado com 30 g/L de sacarose e 5,5 g/L de ágar. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem

por 20 min a 121 °C. Após inoculação das sementes, os tubos foram encaminhados para câmara de crescimento com fotoperíodo de 16h, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e sob lâmpadas fluorescentes branca-frias ($35 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Após 40 dias, os segmentos apicais das plântulas obtidas foram utilizados como explantes para a instalação dos experimentos.

2.3. Serotonina, melatonina e floroglucinol no crescimento e acúmulo de PTOX em raízes de *H. suaveolens* micropropagadas

Segmentos apicais de plântulas já pré-estabelecidas *in vitro* foram excisados, padronizados (1 cm) com auxílio de um bisturi e inoculados na vertical em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS, suplementado com 30 g/L de sacarose e 5,5 g/L de ágar. Nos tratamentos contendo floroglucinol utilizou-se 50 mg/L para a suplementação do meio de cultura (adicionados antes da autoclavagem); o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e posteriormente autoclavado a 121°C , por 20 min. As soluções-estoque (1 mM) da serotonina (Sigma-Aldrich; $\geq 98\%$ de pureza) e melatonina (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ de pureza) foram previamente preparadas por diluição em água destilada e etanol 92 °GL, respectivamente.

Após o resfriamento do meio de cultura, diferentes alíquotas de serotonina ou melatonina foram adicionadas ao meio de cultura com auxílio de seringa e membrana ($0,22 \mu\text{m}$) em câmara de fluxo laminar. Os segmentos apicais foram inoculados no meio de cultura e incubados em uma sala de crescimento mantidos sob 16h/8h (claro/escuro), nível de irradiância de $35 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ fornecidos por lâmpadas fluorescentes branca fria, e a temperatura da sala foi mantida cerca de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 40 dias.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (6x2), sendo 6 concentrações de melatonina ou serotonina (0; 0,25; 0,50; 1,00; 5,00; 10,0 μM) e 2 concentrações de floroglucinol (0 e 50 mg/L). Cada tratamento continha 4 repetições, sendo 5 tubos por repetição (um explante por tubo). Após 40 dias de inoculação dos explantes, avaliou-se o crescimento e o acúmulo de podofilotoxina nas raízes.

2.4. Análise da matéria seca e crescimento *in vitro*

A altura de plântula (AP) foi medida da base da brotação até o meristema apical com auxílio de régua e o comprimento da maior raiz (CR) da base da brotação até a extremidade da maior raiz. As folhas, caules e raízes foram separadas e colocadas em sacos Kraft e mantidas em estufa de circulação de ar forçado a 37°C por 72h ou até atingir peso constante e foram

posteriormente pesadas em balança de precisão para aquisição dos valores de matéria seca das folhas (MSF), caule (MSC) e raízes (MSR). A área foliar (AF) foi mensurada utilizando-se o software Image J para análise de folhas de 10 plântulas representativas por tratamento. A clorofila total foi obtida com clorofilômetro Opti-Sciences (modelo CCM-300), a partir da leitura de 10 plântulas de cada tratamento.

2.5. Análises cromatográficas da podofilotoxina (PTOX)

2.5.1. Preparo de amostras

As raízes das plântulas de *Hyptis suaveolens* micropropagadas foram coletadas e acondicionadas em freezer -80°C. Posteriormente, as amostras foram transportadas em caixa térmica até ao Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais da UFLA e mantidas em freezer a -18 °C, até as análises.

O preparo das amostras seguiu a metodologia descrita por Da Silva et al. (2022). Em síntese, 25 mg de raiz pulverizada de *H. suaveolens* foi sonicada por 15 min em 5 mL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0; 25 mM). Em seguida, foram realizados 2 ciclos de sonicação por 15 min com 5 mL de clorofórmio cada. Uma alíquota de 1,25 mL da fase orgânica de cada ciclo foi reunida. O clorofórmio foi evaporado a temperatura ambiente sob capela de exaustão. Em seguida, o extrato obtido foi ressuspenso em 1 mL de metanol grau HPLC e centrifugados (10 min; 10.000 rpm). O sobrenadante (10 µL) foi injetado automaticamente em sistemas de cromatografia líquida.

2.5.2. Caracterização por UHPLC-UVMS/MS e HPLC-DAD

A caracterização inequívoca da presença de PTOX nas amostras foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho com um detector ultravioleta acoplado à espectrometria de massas (UHPLC-UVMS/MS), comparadas a padrão autêntico de PTOX (Sigma-Aldrich; 98% de pureza). Estas análises foram realizadas na central Analítica do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos (CA-DPNA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As análises empregaram um sistema de UHPLC Dionex™ Ultimate™ 3000 System, junto à Fleet LCQ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), consistindo em um forno, desgaseificador de solvente, uma bomba de ultra-alta pressão, um amostrador automático, um detector de matriz de diodos e um controlador de temperatura da coluna. Empregou-se uma coluna Acquity UHPLC BEH C18 (2,1 mm x 150

mm x 1,7 μ m, Waters, Milford, MA), com fluxo de 0,20 mL/min. A temperatura da coluna foi de 30° C e a fase móvel foi água contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). Empregou-se eluição em gradiente: 0–6 min, 10% (B); 6–35 min, 10–100% (B); 35–40 min, 100% (B); 40–40,1 min, 100–10% (B); 40,1–45 min, 10% (B). Após cada injeção, foram realizadas limpeza (98% B, 6 min) e condicionamento da coluna (7 min). O espectrômetro de massas (MS), equipado com fonte de electrospray (ESI), foi operado no modo de ionização positivo. O nitrogênio de alta pureza (N₂) foi usado como “*sheath gas*” (35 unidades arbitrárias) e “*auxiliary gas*” (10 unidades arbitrárias). O hélio de alta pureza (He) foi usado como gás de colisão (*collision gas*). Os parâmetros MS foram os seguintes: tensão de fonte 5 kV, tensão capilar 7 V, tensão de lente do tubo 65 V e temperatura capilar 400 °C. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de 100–1000 *m/z*. Para os estudos de fragmentação, foi utilizado um CID (*Collision Induced Dissociation*) de 35 eV.

Adicionalmente, a caracterização da presença de PTOX nas amostras foram realizadas por HPLC-DAD (nas condições experimentais descritas no item seguinte) por meio de comparação dos tempos de retenção, espectros no UV e co-injeção com PTOX de referência.

2.5.3. Quantificação de PTOX por HPLC-DAD

A quantificação da PTOX seguiu a metodologia desenvolvida e validada por Da Silva et al. (2022). Essas análises foram realizadas em 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 μ m x 150 mm x 4,6 mm I.D.) e pré-coluna Zorbax ODS (12,5 mm x 4,6 mm ID, 5 μ m) (Agilent Technologies®, EUA) com fluxo de 1 mL/min. As análises foram realizadas a 25 °C, com detecção no comprimento de onda de 210 nm. Os eluentes foram água ultrapura (A) e acetonitrila (B), ambos contendo ácido fosfórico de 0,1% (v/v). Empregou-se eluição em gradiente linear de 50% B para 70% B em 2,5 min, seguido de 70% B para 95% B por 2,5 min; na sequência empregou-se eluição isocrática de 95% B por 1 min; eluição em gradiente linear de 95% para 50% por 2 min; eluição isocrática de 50% por 2 min, retornando à condição inicial. As análises foram realizadas a 25 °C, com detecção no comprimento de onda de 210 nm.

Para a quantificação de PTOX no presente estudo o método foi revalidado quanto a linearidade e os limites de detecção e quantificação. 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 com àquelas de amostras analisadas de casa de vegetação e de cultivos *in vitro*.

A linearidade foi determinada utilizando-se soluções de referência de PTOX (Sigma-Aldrich; 98% de pureza) a 1,0 mg/L. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de diferentes alíquotas de três soluções de referência de PTOX, na faixa de 2 a 8 μ L. As curvas analíticas foram determinadas em relação à massa injetada de PTOX (2,5; 10; 25; 50 e 100 ng de PTOX), em três dias consecutivos. Os dados obtidos para cada curva foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes foram calculados (Vide Figura 8 – Curvas 1 a 3). As curvas obtidas nos três dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de variância ($p < 0,05$). O tratamento estatístico desses dados e os gráficos foram realizados no *software* Graph PAd Prism[®], versão 8.3.1 (GraphPad Software, 2020).

2.6. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o *software* R.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Serotonina, melatonina e floroglucinol no crescimento de raízes de *H. suaveolens* micropropagadas

Diferença significativa foi observada entre as concentrações de serotonina e floroglucinol (TABELA 1). O meio suplementado com floroglucinol ou na ausência não afetou a altura da plântula, 1,85 e 1,79 cm respectivamente. A serotonina na concentração de 0,25 μ M promoveu maior crescimento da parte aérea (2,06 cm). A altura de plântula quando cultivada em meio contendo serotonina e/ou floroglucinol não apresentou superioridade ao tratamento controle. A adição de serotonina no meio de cultura não aumentou o número de folhas e de segmentos nodais. No entanto, floroglucinol estimulou o maior número de folhas, área foliar e segmentos nodais.

No geral a adição de 0,5 μM de serotonina induziu aumento do número de raízes (6,18) e o comprimento das raízes (2,56 cm). Além disso, a concentração de 50 mg/L de floroglucinol acrescida de 0,25 μM de serotonina promoveu maior CR (3,20 cm) e 50 mg/L de floroglucinol e 0,50 μM de serotonina promoveu maior NR (6,70). A serotonina pode agir como regulador de crescimento influenciando o crescimento de plantas (RAVISHANKAR; RAMAKRISHNA, 2016).

As plântulas cultivadas sem adição de floroglucinol apresentaram maior acúmulo de clorofilas totais (292,4 mg/cm²) e o meio suplementado com serotonina as plântulas acumularam menor concentração de clorofila do que na ausência (339,0 mg/cm²) (TABELA 1). Visualmente, notou-se maior número de tricomas nas folhas das plântulas cultivadas somente com serotonina, ao passo que as plântulas cultivadas em meio de cultura contendo floroglucinol apresentaram raízes mais esbranquiçadas. Além disso, também houve toxicidade nas concentrações 5 e 10 μM de serotonina nos tratamentos sem a suplementação com floroglucinol. Portanto, a adição de 50 mg/L de floroglucinol reduziu o efeito da toxicidade da serotonina quando em conjunto com esta indolamina (FIGURA 1).

Figura 1 – Plântulas de *Hyptis suaveolens* L. oriundas de segmentos apicais cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de serotonina em ausência e presença de floroglucinol no meio de cultura, aos 40 dias.

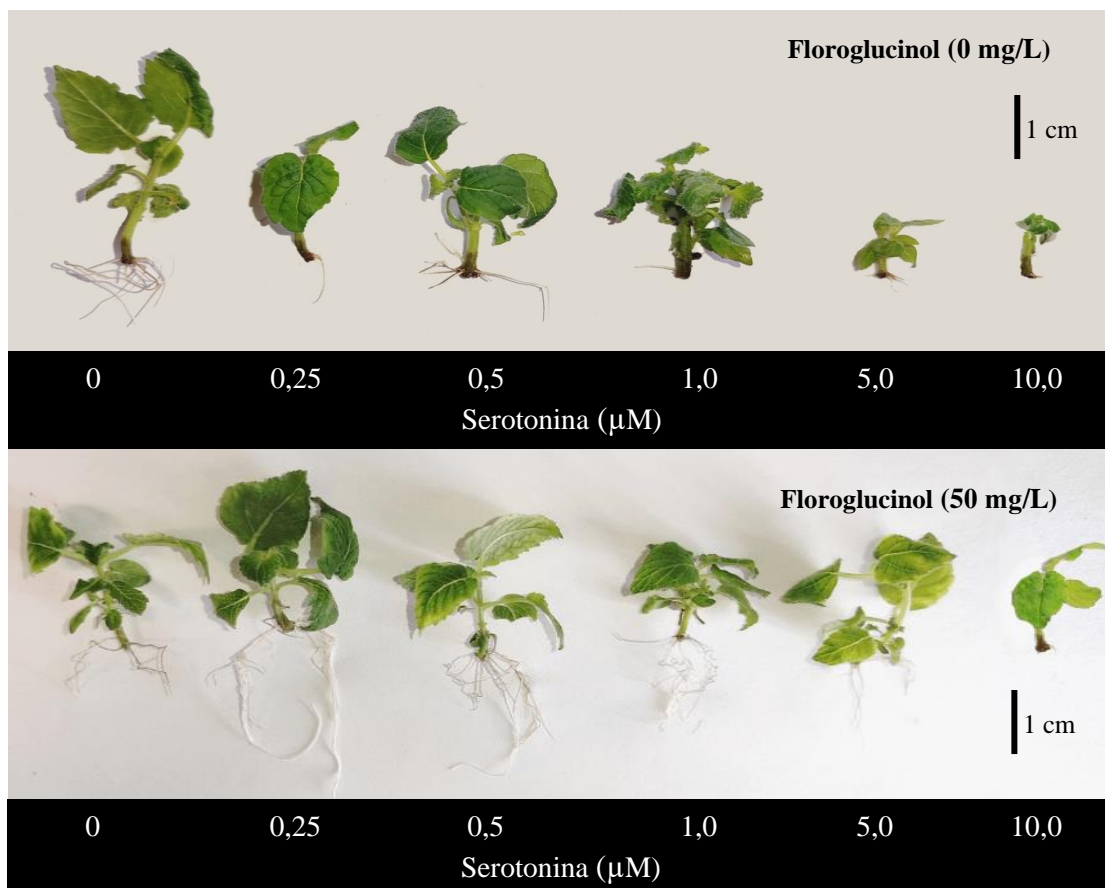


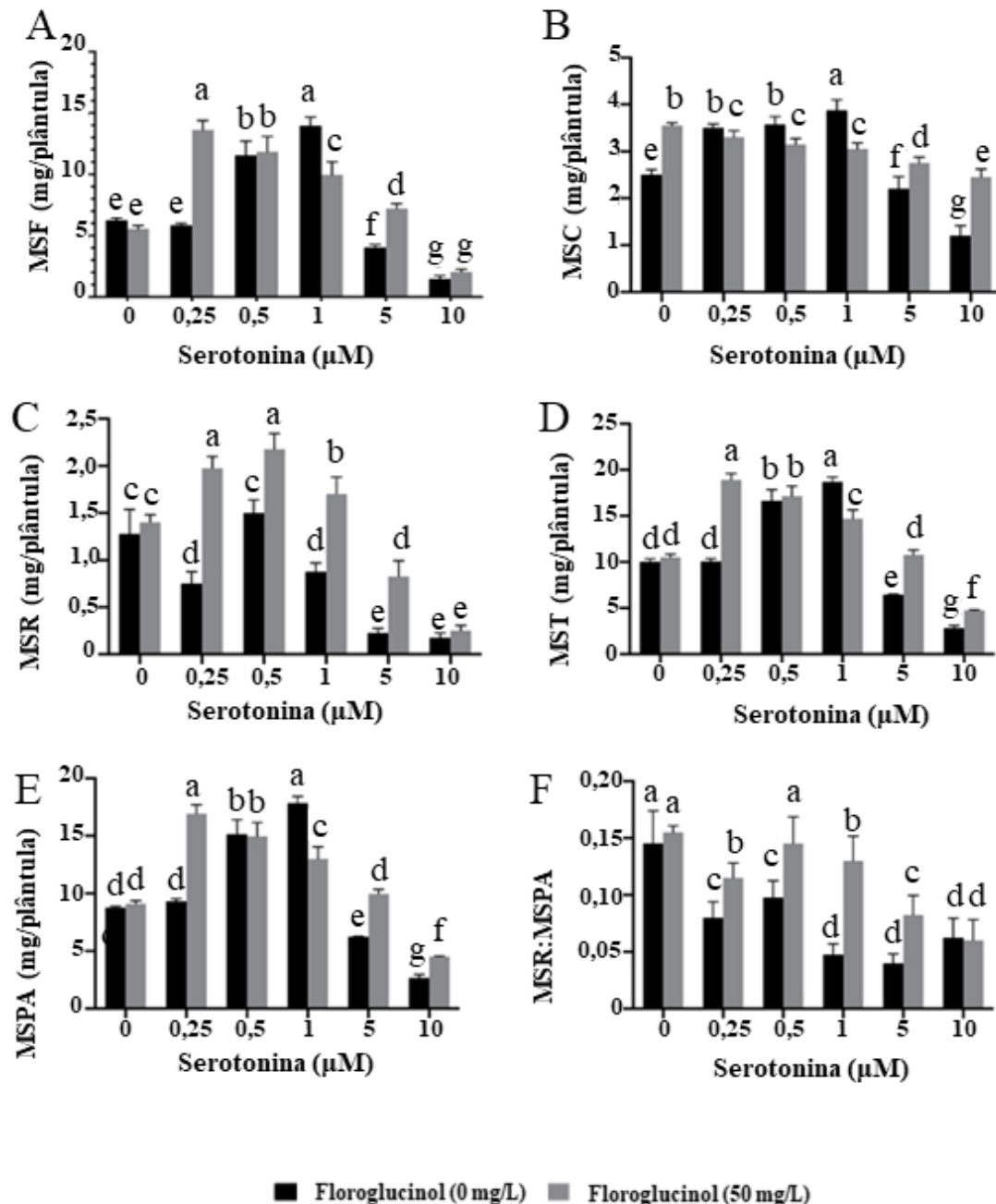
Tabela 1 – Valores de altura da plântula (AP), número de folhas (NF), número de segmentos nodais (NSN), área foliar (AF), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR) e clorofilas totais (Chl) de plântulas micropropagadas de *Hyptis suaveolens* oriundas de segmentos apicais cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de serotonina e floroglucinol, aos 40 dias.

Floroglucinol mg/L	Serotonina μM	AP cm	NF	NSN	AF cm^2	CR cm	NR	Chl mg/cm^2
0	0,0	2,29 a	7,60 a	3,80 a	1,53 a	1,93 d	4,90 c	338,0 a
0	0,25	2,13 a	4,40 d	2,20 d	1,45 a	1,32 d	1,75 e	341,6 a
0	0,5	1,89 b	4,50 d	2,25 d	1,46 a	2,08 c	5,65 b	281,0 b
0	1,0	1,91 b	7,90 a	3,95 a	1,12 c	0,59 g	1,25 e	264,1 b
0	5,0	1,29 c	4,70 d	2,35 d	0,55 e	0,56 g	1,65 e	280,7 b
0	10,0	1,23 c	2,30 f	1,15 f	0,40 f	0,28 h	1,35 e	249,0 b
50	0,0	2,02 b	7,80 a	3,90 a	1,10 c	1,64 e	4,70 c	340,0 a
50	0,25	2,00 b	6,20 b	3,10 b	1,54 a	3,20 a	5,00 c	246,7 b
50	0,5	2,01 b	4,10 d	2,05 d	1,51 a	3,04 b	6,70 a	304,3 a
50	1,0	1,87 b	6,10 b	3,05 b	1,29 b	1,61 e	4,00 d	268,6 b
50	5,0	2,13 a	5,50 c	2,75 c	1,06 c	1,83 d	1,50 e	215,3 c
50	10,0	1,18 c	3,40 e	1,70 e	0,90 d	0,32 h	1,30 e	196,3 c
Média: Floroglucinol (mg/L)								
0		1,79 a	5,23 b	2,62 b	1,09 b	1,12 b	2,75 b	292,4 a
50		1,85 a	5,53 a	2,76 a	1,23 a	1,94 a	3,87 a	261,9 b
Média: Serotonina (μM)								
0,0		2,15 a	7,70 a	3,85 a	1,31 b	1,79 c	4,80 b	339,0 a
0,25		2,06 a	5,30 c	2,65 c	1,49 a	2,26 b	3,38 c	294,2 b
0,5		1,90 b	4,30 d	2,15 d	1,48 a	2,56 a	6,18 a	292,7 b
1,0		1,89 b	7,00 b	3,50 b	1,21 c	1,11 d	2,63 d	266,3 c
5,0		1,71 c	5,10 c	2,55 c	0,81 d	1,19 d	1,57 e	248,0 d
10,0		1,20 d	2,85 e	1,43 e	0,65 e	0,30 e	1,33 e	222,7 e

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Houve diferença significativa em todas as variáveis analisadas quanto à biomassa seca das plântulas após 40 dias de cultivo (FIGURA 2). Somente a adição de floroglucinol não influenciou o acúmulo da matéria seca da plântula (MSF, MSR, MSPA e MST). No geral, o meio suplementado com 0,25 μM serotonina mais 50 mg/L de floroglucinol promoveu o acúmulo de matéria seca das folhas (MSF), raízes (MSR), parte aérea (MSPA) e total (MST). A plântula cultivada neste meio acumulou 2,3 MSF em relação ao controle. Quando o meio foi suplementado com 1,0 μM de serotonina sem adição de floroglucinol houve acúmulo na MSF, MSC, MSPA e MST. Neste meio o acúmulo de MSF foi de 2,2 em relação ao controle (FIGURA 2).

Figura 2 – A) Matéria seca das folhas (MSF); B) caule (MSC); C) raiz (MSR); D) total (MST); E) parte aérea (MSPA); F) razão raiz/parte aérea (MSR:MSPA) de plântulas micropropagadas de *Hyptis suaveolens* oriundas de segmentos apicais cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de serotonina e floroglucinol, aos 40 dias.



Fonte: Da autora (2023).

Analisando apenas a MSR, onde ocorre a síntese de PTOX, o meio suplementado com 0,25 μM serotonina mais floroglucinol acumulou 1,5 vezes matéria seca (1,98 mg/plântula) em relação ao controle e o meio 0,5 μM serotonina com adição de floroglucinol acumulou 1,7 vezes (2,17 mg/plântula). A adição somente de floroglucinol (1,40 mg/plântula) não aumentou o

acúmulo de MSR em relação ao controle (1,28 mg/plântula) (FIGURA 2C). Pelagio-Flores et al. (2011), reportaram aumento de duas vezes no desenvolvimento de raízes adventícias de plântulas de *Arabidopsis thaliana* com o meio suplementado de 150 a 600 μM de serotonina. A serotonina é derivada do triptofano e tem estrutura molecular similar à auxina AIA, isto pode explicar porque maior acúmulo de MSR com adição desse regulador de crescimento. Xu, Cheng e Zhong (2021) reportaram que a combinação de auxina AIB (7,4 μM) e floriglucinol (0,24 mM) aumentou o enraizamento *in vitro* de *Paeonia ostii* em 41,5%.

Desta forma, a combinação de floriglucinol e serotonina, semelhante a auxina, pode ter influenciado o enraizamento das plântulas de *Hyptis suaveolens*, assim como o crescimento, uma vez que as raízes são essenciais para a absorção dos nutrientes disponíveis no meio de cultura.

No que diz respeito ao uso de melatonina isolada ou em combinação com floriglucinol, diferença estatisticamente significativa foi observada entre os tratamentos (TABELA 2). O meio de cultura suplementado com 1,0 μM de melatonina possibilitou maior altura da plântula (2,91cm). De forma geral, o uso de floriglucinol (50 mg/L) não causou o aumento da altura da plântula, sendo estatisticamente igual ao tratamento controle. Analisando apenas o efeito da melatonina na altura da plântula, o meio suplementado com 0,5 μM (2,37 cm) e 1,0 μM (2,45 cm) promoveu ganho de 25 e 27%, respectivamente, em relação ao controle (1,89 cm). Andrade et al. (2015) observaram valores semelhantes de altura de plântulas (de 1,1 a 3,0 cm) ao avaliarem o cultivo de segmentos apicais de *H. suaveolens* sob diferentes intensidades luminosas (13 a 69 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$), indicando melhores resultados a partir de 28 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$.

A aplicação de melatonina exógena, como regulador de crescimento, influencia no crescimento das plantas e produção de biomassa (QIAO et al., 2019). De acordo com Jyoti (2013), a suplementação com melatonina aumentou o número de brotos (25 μM) e altura da plântula de avelã (*Corylus sp.*) *in vitro* na concentração de 25 a 200 μM .

A adição de floriglucinol no meio de cultura inibiu o número de segmentos nodais de 2,91 para 2,51 e de folhas de 5,82 para 5,01 nas plântulas de *H. suaveolens*. No geral, o meio suplementado com 0,25 a 1,0 μM de melatonina promoveu maior número de folhas (6,85 a 7,00) e número de segmento nodal (3,42 a 3,50) (TABELA 2). As plântulas cultivadas no meio suplementado com 1,0 μM de melatonina se destacaram em relação ao desenvolvimento da parte aérea (TABELA 2; FIGURA 3). O uso de floriglucinol não aumentou o número de brotos em *Tinospora cordifolia* (PILLAI; SIRIL, 2019). Entretanto, a combinação de 1 mM de floriglucinol, associada a 30 μM de BAP em meio WPM, foi essencial para o desenvolvimento da parte aérea de *Pongamia pinnata* (TAN et al., 2018).

Plântulas cultivadas em meio suplementado com floroglucinol apresentaram área foliar de 1,12 cm² em relação ao meio sem adição com 0,92 cm², assim como o meio suplementado com 0,5 (1,38 cm²) e 1,0 μM (1,39 cm²) de melatonina (TABELA 2). O meio suplementado com floroglucinol inibiu o acúmulo de clorofila total, ao passo que a suplementação somente com 1,0 μM de melatonina alcançou maior acúmulo de clorofila com um valor de 355,2 mg/cm² (TABELA 2). Além de promover o enraizamento, a melatonina pode influenciar o acúmulo de clorofilas, área foliar e melhorar o desenvolvimento da parte aérea (ERLAND; SAXENA, 2018). A suplementação com 200 μM de melatonina levou ao aumento do acúmulo de clorofilas em duas cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivadas *in vitro* sob condições de estresse salino (AHMAD et al., 2022).

Figura 3 – Plântulas de *Hyptis suaveolens* L. oriundas de segmentos apicais cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de melatonina em ausência e presença de floroglucinol no meio de cultura, aos 40 dias.

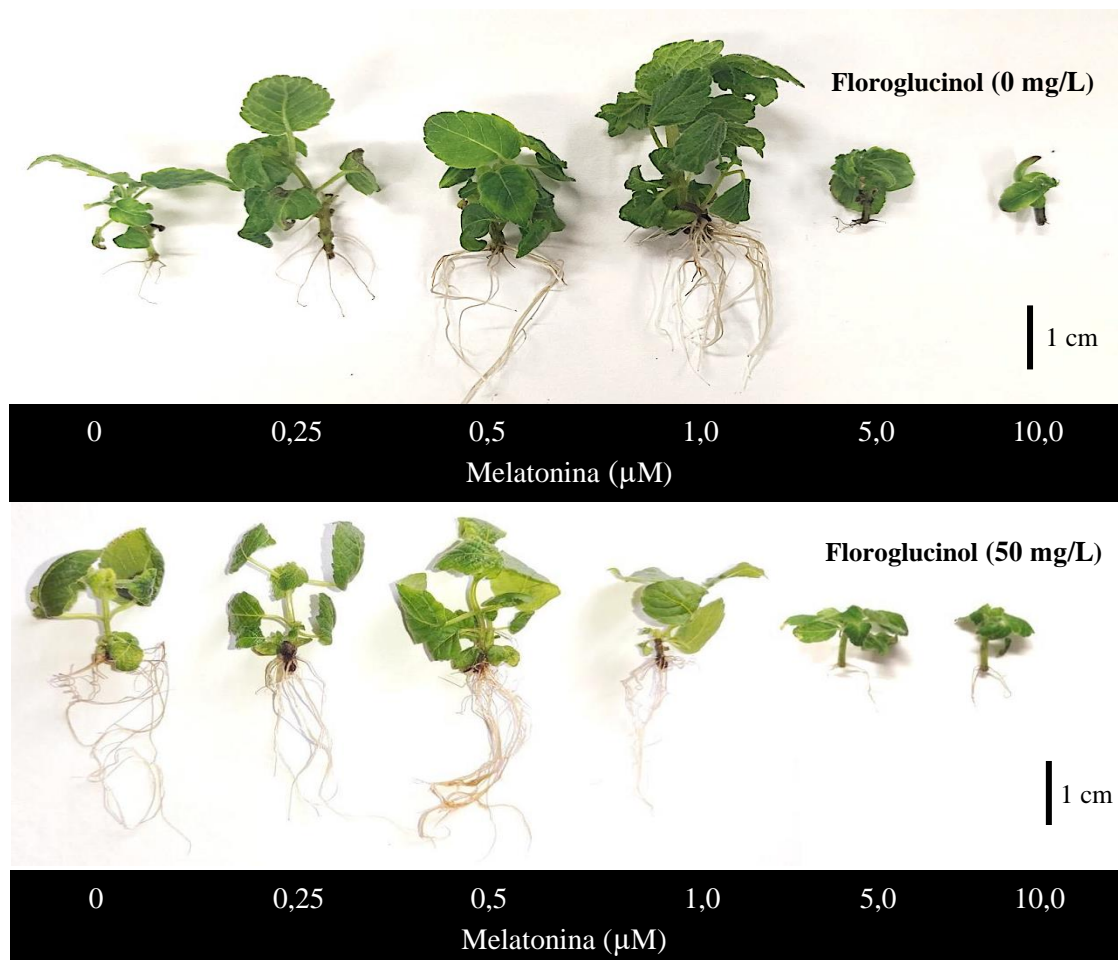


Tabela 2 – Valores de altura da plântula (AP), número de folhas (NF), número de segmentos nodais (NSN), área foliar (AF), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR) e clorofilas totais (Chl) de plântulas micropropagadas de *Hyptis suaveolens* oriundas de segmentos apicais cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de melatonina e floroglucinol, aos 40 dias.

Floroglucinol mg/L	Melatonina µM	AP cm	NF	NSN	AF cm ²	CR cm	NR	Chl mg/cm ²
0	0,0	1,62 f	5,70 c	2,85 c	0,85 b	1,27 d	3,25 f	257,2 b
0	0,25	2,09 d	6,90 b	3,45 b	0,87 b	1,91 c	3,30 f	260,3 b
0	0,5	2,30 c	6,80 b	3,40 b	1,33 a	3,90 a	7,30 d	265,4 b
0	1,0	2,91 a	10,00 a	5,00 a	1,48 a	3,70 b	10,50 b	355,2 a
0	5,0	0,60 g	3,10 d	1,55 e	0,54 c	0,30 e	1,60 g	228,8 c
0	10,0	0,41 h	2,40 d	1,20 e	0,50 c	0,20 e	1,20 g	231,9 c
50	0,0	2,18 c	6,20 c	3,10 c	1,22 a	3,80 b	7,00 d	230,1 c
50	0,25	2,20 c	6,80 b	3,40 b	1,28 a	3,60 b	8,00 c	231,2 c
50	0,5	2,45 b	7,00 b	3,50 b	1,43 a	4,09 a	11,55 a	235,3 c
50	1,0	1,92 e	4,00 c	2,00 d	1,30 a	3,40 b	6,05 e	232,3 c
50	5,0	0,78 g	3,00 d	1,50 e	0,84 b	0,41 e	2,75 f	234,4 c
50	10,0	0,59 g	3,10 d	1,50 e	0,62 c	0,37 e	1,95 g	225,9 c
Média: Floroglucinol (mg/L)								
0		1,65 a	5,82 a	2,91 a	0,92 b	1,88 b	4,52 b	266,5 a
50		1,68 a	5,01 b	2,51 b	1,12 a	2,63 a	6,22 a	231,5 b
Média: Melatonina (µM)								
0,0		1,89 c	5,95 b	2,98 b	1,03 b	2,53 c	5,13 c	243,7 b
0,25		2,14 b	6,85 a	3,42 a	1,08 b	2,75 c	5,65 c	245,8 b
0,5		2,37 a	6,90 a	3,45 a	1,38 a	3,99 a	9,43 a	250,4 b
1,0		2,41 a	7,00 a	3,50 a	1,39 a	3,54 b	8,27 b	293,7 a
5,0		0,69 d	3,05 c	1,52 c	0,69 c	0,38 d	2,17 d	231,6 c
10,0		0,50 e	2,70 c	1,35 c	0,56 c	0,40 d	1,57 d	228,9 c

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott à 5% de probabilidade.

Maior comprimento de raiz (CR) foi observado no meio suplementado com 0,5 µM melatonina (3,90 cm) e 0,5 µM melatonina mais 50 mg/L floroglucinol (4,09 cm). O maior NR (11,55) foi observado ao utilizar 0,5 µM de melatonina e 50 mg/L de floroglucinol. No geral, o meio suplementado com floroglucinol (50 mg/L) promoveu o maior comprimento de raiz (2,63 cm) e número de raízes (6,22). Aqui também no geral, o meio suplementado com melatonina (0,5 µM) promoveu maior CR (3,99 cm) e NR (9,43), sendo 1,58 e 1,84 vezes superior ao tratamento controle (2,53 cm e 5,13), respectivamente (TABELA 2).

Quando foi detectada em vegetais, a melatonina foi inicialmente proposta como uma nova auxina, devido às estruturas moleculares serem bastante semelhantes (ERLAND; SAXENA, 2018). Contudo, estudos indicam que a aplicação de melatonina exógena foi capaz de afetar o desenvolvimento radicular (HERNANDEZ-RUIZ et al., 2004; ARNAO; HERNANDEZ-RUIZ, 2017). A suplementação do meio de cultura com 600 µM de melatonina

aumentou o enraizamento de segmentos apicais de *Withania somnifera* (ADIL et al., 2015), ao passo que a concentração de 5 μM foi suficiente para uma resposta efetiva no enraizamento *in vitro* de *Hypericum perforatum* (MURCH; SAXENA, 2004). Diferentemente das concentrações utilizadas nestes estudos, a partir de 5 μM de melatonina foi possível observar efeito tóxico nas plântulas indicando que a *H. suaveolens* foi muito sensível à melatonina (TABELA 2; FIGURA 3). Altas concentrações de melatonina (50 μM) inibiram a produção de biomassa em calos de *Lepidium sativum* devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ULLAH et al., 2019).

Além disso, o floroglucinol também influencia o desenvolvimento da parte radicular das plântulas. Gómez-Pedraza et al. (2019) observaram que o floroglucinol aumentou significativamente o número de raízes por plântulas de *Cosmos atrosanguineus*, de 11,1 para 24,2 raízes/plântula. Para *Ansellia africana*, maior número de raízes foi observado ao utilizar 15 μM de AIB e 30 μM de floroglucinol na micropropagação (BHATTACHARYYA et al., 2018). O meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 396,5 mM de floroglucinol e 14,2 mM de AIB promoveu o enraizamento de 79% dos segmentos nodais de *Diospyros crassiflora* cultivados *in vitro*, sendo indicado pelos autores como o primeiro relato de sucesso de micropropagação da espécie (TCHOUGA et al., 2020).

O floroglucinol favorece o enraizamento das plântulas *in vitro* de plantas medicinais como *Arnica montana* (BUTHUC-KEUL; DELIU, 2001), *Bacopa monnieri* (ANTONY CAESAR et al., 2010), *Carthamus tinctorius* (SUJATHA; KUMAR, 2007), *Crataeva magna* (BOPANA; SAXENA, 2009) e *Juglans regia* (SHARIFIAN et al., 2007). Entretanto, sua ação é potencializada ao ser associada com uma auxina. Há grande semelhança entre a molécula de melatonina e auxina, assim, pode ser que este fato tenha sido essencial para os melhores resultados observados ao se adicionar 50 mg/L de floroglucinol.

Houve diferença significativa entre os tratamentos quanto a matéria seca das folhas (MSF), caule (MSC), raiz (MSR), total (MST), parte aérea (MSPA) e razão raiz/parte aérea (MSR:MSPA) de plântulas micropropagadas de *Hyptis suaveolens* (FIGURA 4). Observou-se que as concentrações de melatonina de 5 e 10 μM foram tóxicas às plântulas e acumulou os menores valores de MSF, MSC, MSR e MST. Estudos reportaram a influência da melatonina no acúmulo de biomassa *in vitro* de *Leucojum aestivum* (PTAK et al., 2019), *Lupinus albus* (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2007), *Prunella vulgaris* (FAZAL et al. 2018) e *Lepidium sativum* (ULLAH et al. 2019).

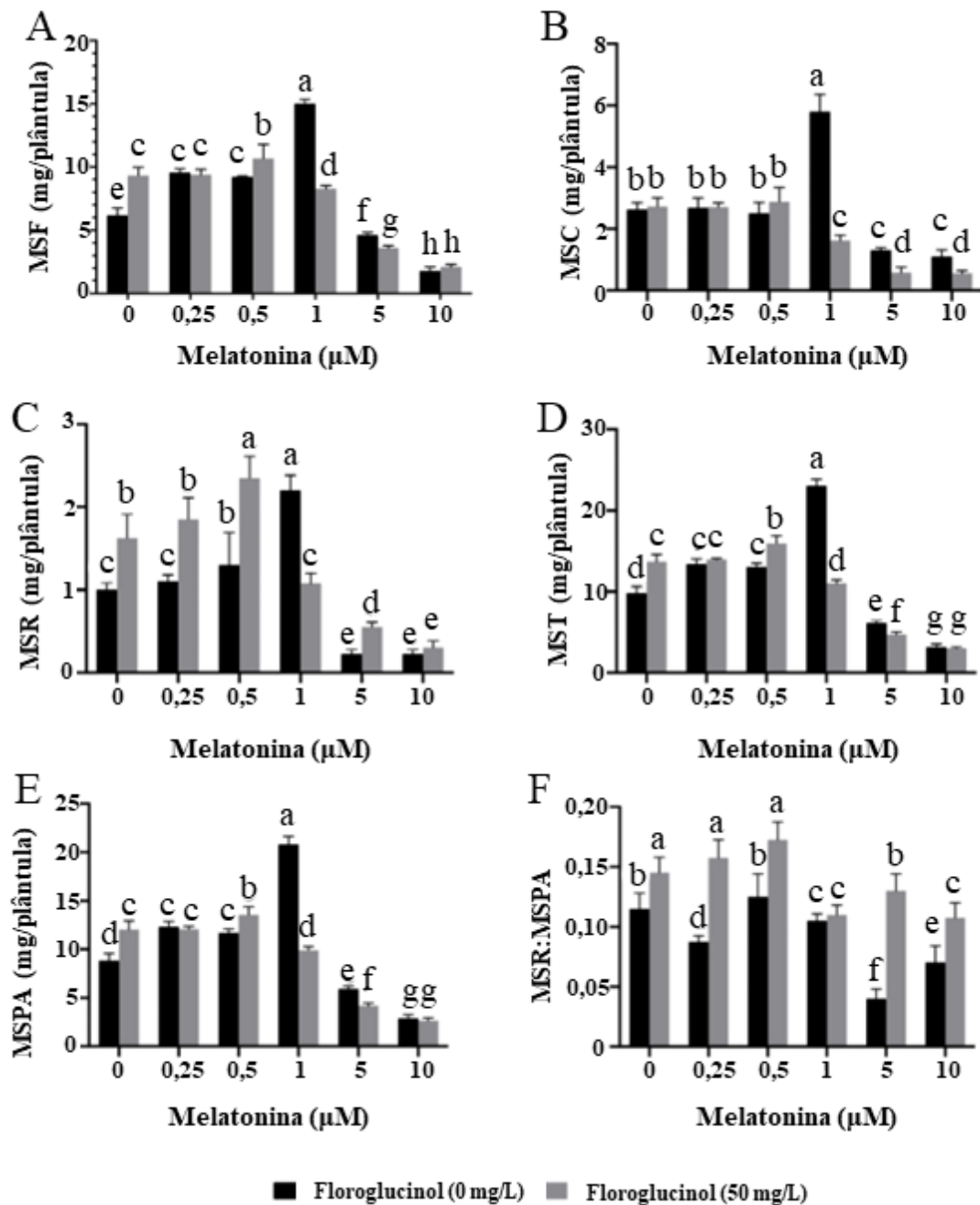
Maiores valores de MSF foram observados no meio contendo somente 1,0 μM de melatonina (15,1 mg/plântula). Além disso, observou-se menores valores de MSF quando o

meio foi suplementado com floroglucinol nesta mesma concentração de melatonina (8,27 mg/plântula). A MSF no controle foi de 6,18 mg/plântula, porém, ao ser adicionado floroglucinol (50 mg/L) este valor passou a ser de 9,33 mg/plântula. Entretanto, em relação à adição de floroglucinol, somente houve incremento na MSF nas concentrações de 0, 0,5 e 10 μM de melatonina, não sendo observada uma correlação entre a adição de floroglucinol e aumento da MSF. Portanto, a MSF depende da resposta morfofisiológica da espécie à combinação de floroglucinol e melatonina. Maiores valores de MSC, MSR, MST e MSPA também foram observados no meio contendo somente 1,0 μM de melatonina.

O maior acúmulo de MSR foi observado no meio suplementado com 1,0 μM de melatonina (2,2 mg/plântula) e o meio com 0,5 μM de melatonina mais floroglucinol 50 mg/L (2,35 mg/plântula), sendo significativamente iguais ($p > 0,05$). Este acúmulo de MSR foi de 2,2 e 2,3 vezes, respectivamente, em relação ao controle. Observou-se que a associação da melatonina até a concentração de 1 μM com floroglucinol beneficiou a MSR em relação ao uso de melatonina somente (FIGURA 4).

Andrade et al (2015) ao avaliarem a intensidade de luz na micropropagação da *Hyptis suaveolens* relataram valores superiores aos encontrados no presente estudo em relação à MSR advindas de segmentos apicais (4,3 mg/plântula) e nodais (5,5 mg/plântula). Essa divergência nos resultados se dá pelo fato da intensidade luminosa utilizada nos experimentos, onde os autores utilizaram 69 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, corresponde a intensidade luminosa quase 2 vezes maior que a utilizada neste experimento (35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$).

Figura 4 – A) Matéria seca das folhas (MSF); B) caule (MSC); C) raiz (MSR); D) total (MST); E) parte aérea (MSPA); F) razão raiz/parte aérea (MSR:MSPA) de plântulas micropropagadas de *Hyptis suaveolens* oriundas de segmentos apicais cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de melatonina e floroglucinol, aos 40 dias.

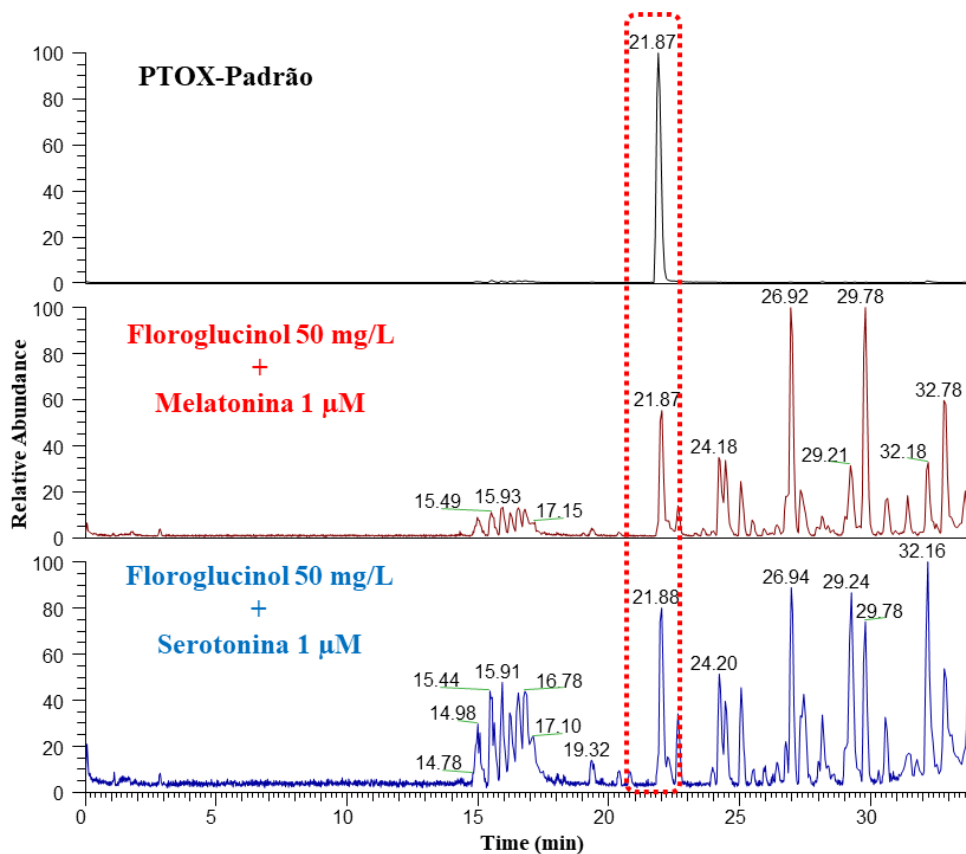


Fonte: Da autora (2023).

3.2. Serotonina, melatonina e floroglucinol no acúmulo de PTOX em raízes de *H. suaveolens* micropropagadas

Para confirmar de forma inequívoca a presença de PTOX nas amostras de raízes de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* com melatonina e serotonina, estas foram analisadas por UHPLC-MS/MS em modo positivo (FIGURA 5), comparando-se com padrão autêntico de PTOX. Nota-se na Figura 5, a exata posição entre o pico das amostras em 21,8 minutos com o padrão PTOX.

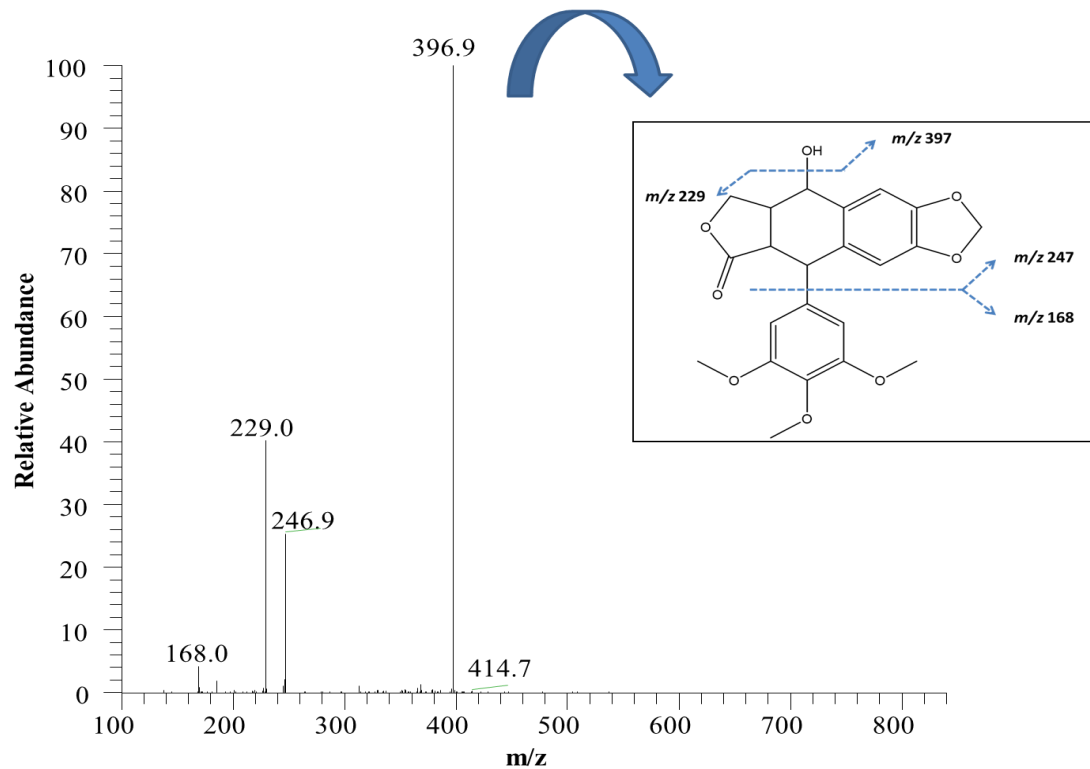
Figura 5 – Cromatogramas de UHPLC-MS/MS (modo positivo) do padrão de PTOX para amostras de Floroglucinol 50 mg/L + Melatonina 1 μ M e Floroglucinol 50 mg/L + Serotonina 1 μ M.



Fonte: Da Autora (2023).

Através da análise do perfil de fragmentação do padrão e do tempo de retenção foi possível confirmar a presença da PTOX nas amostras, conforme mostra o espectro de MS/MS da Figura 6.

Figura 6 - Espectro de MS/MS do íon de m/z 414.7 $[M+H]^+$

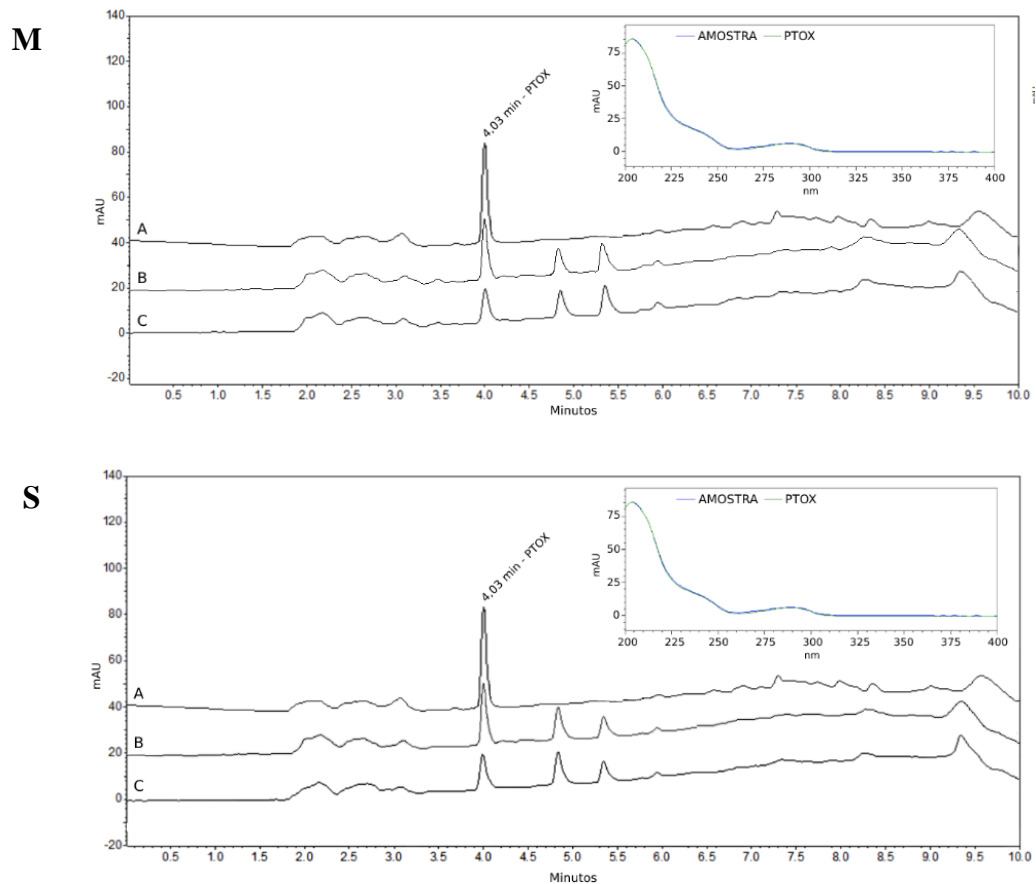


Fonte: Da Autora (2023).

A molécula de PTOX ($C_{22}H_{22}O_8$), em modo positivo de análise, gera o íon precursor de m/z 415 Da $[M+H]^+$. No espectro de MS/MS do íon m/z 414.7 $[M+H]^+$, tanto do padrão quanto da amostra (TR 21.87 min), foi possível observar os fragmentos de m/z 397, 247, 229 e 168 característicos dessa substância (ZHAO et al., 2008). O fragmento mais abundante de m/z 397 refere-se a perda de uma molécula de água $[M+H-H_2O]^+$ pelo íon precursor protonado. A perda da porção 3-trimetoxibenzeno (ArH, 168 Da) da molécula de PTOX desidratada, gera o fragmento de m/z 229 $[M-H_2O-ArH+H]^+$. O fragmento da porção ArH de m/z 168 também foi observado no espectro de MS/MS. Por fim, o fragmento de m/z 247 $[M-ArH+H]^+$ refere-se a perda de ArH do íon precursor antes da desidratação.

Ademais, conforme mostra a Figura 7, na análise dos perfis cromatográficos obtidos por HPLC-DAD foi possível caracterizar a presença de PTOX nas amostras em TR = 4,03 min, observada pela comparação do tempo de retenção da amostra com o perfil cromatográfico do padrão autêntico, assim como da co-injeção. Além disso, os espectros no UV obtidos *on-line* para as amostras dos experimentos com melatonina (Floroglucinol 50 mg/L + Melatonina 1,0 μ M) e serotonina (Floroglucinol 50 mg/L + Serotonina 0,5 μ M) foram idênticos ao de PTOX de referência, apresentando máximos de absorção em 205 nm (Figura 7).

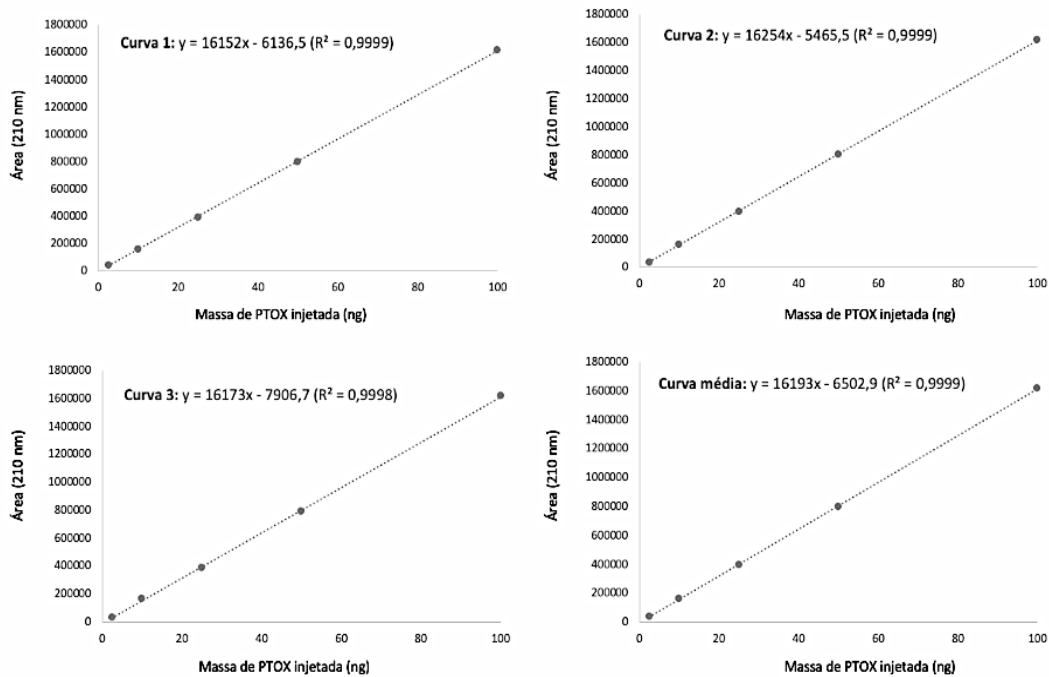
Figura 7 – Perfis cromatográficos obtidos por HPLC-DAD de amostras representativas do experimento com melatonina (M) e serotonina (S). A: padrão de PTOX; B: Co-injeção da amostra com o padrão PTOX; C: amostra. Os espectros no UV foram obtidos *on-line* pelo detector DAD para a amostra e o padrão PTOX a 210 nm.



Fonte: Da Autora (2023).

Para a quantificação de PTOX foram obtidas 3 curvas analíticas que indicaram relação linear entre a massa injetada de PTOX (ng) *versus* a área do pico correspondente, sendo obtidos coeficientes de determinação (r^2) entre 0,9998 e 0,9999. As três curvas analíticas foram estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$), sendo a curva média ($y=16193x - 6502,9$; $r^2=0,999$) empregada nos cálculos de quantificação de PTOX (FIGURA 8).

Figura 8 – Curvas analíticas e média das curvas obtidas por HPLC-DAD, em 3 dias consecutivos de avaliação do padrão podofiloxina (PTOX) e condições do equipamento.



Fonte: Da autora (2023).

Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base nos parâmetros das curvas padrão obtidas e utilização das equações: $LD = 3,3 s/S$ e $LQ = 10 s/S$; onde, s = desvio padrão do intercepto da curva; S = inclinação da curva analítica, cujos dados estão apresentados na Tabela 3. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,25 e 0,75 ng de massa injetada.

Tabela 3 – Limites de quantificação e detecção determinados com base nos parâmetros das curvas analíticas obtidas pelas condições cromatográficas.

Parâmetro da curva	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média
Intercepto com eixo y	6136,5	5465,5	7906,7	6502,9
Desvio padrão do intercepto (entre as 3 curvas)			1217,2	
Inclinação	16152	16254	16173	16193
Limite de quantificação (ng)	0,75	0,75	0,75	0,75
Limite de detecção (ng)	0,25	0,25	0,25	0,25

Fonte: Da Autora (2023).

O acúmulo de PTOX foi afetado quando a plântula foi cultivada no meio suplementado com diferentes concentrações de melatonina e floroglucinol. A concentração de 50 mg/L de floroglucinol e 1,0 μ M de melatonina (53,54 μ g/g de raiz) acumulou 2,1 vezes em relação ao controle (25,84 μ g/g de raiz). Entretanto, foi observado que somente a adição de melatonina no

meio de cultura não foi suficiente para induzir a produção de PTOX, sendo significativamente igual ou inferior ao tratamento controle (TABELA 4).

Da Silva et al. (2022) quantificaram a PTOX em raízes adventícias de *H. suaveolens* obtidas a partir de folhas sob diferentes condições de luminosidade: escuro (10,72 µg/g) e sob luzes LED vermelha monocromática (9,93 µg/g). Além disso, o uso de ANA inibiu a síntese de PTOX ao passo que o cultivo das raízes em meio de cultura MS suplementado com AIB proporcionou maior produção de PTOX.

A melatonina tem sido considerada como um regulador de crescimento que atua em diversas vias metabólicas, influenciando a morfogênese e o metabolismo secundário das plantas medicinais (MURCH et al., 2001; MURCH; SAXENA, 2002; ERLAND et al., 2017). A adição de melatonina estimulou a biossíntese de alcaloides e licorina em *Leucojum aestivum* (PTAK et al., 2019). Além disso, a melatonina está ligada à regulação de enzimas relacionadas ao metabolismo e assimilação de nitrogênio (QIAO et al., 2019).

O acúmulo de PTOX também foi afetado quando a plântula foi cultivada no meio suplementado com diferentes concentrações de serotonina e floroglucinol. O meio com adição de 1,0 µM serotonina e 50 mg/L de floroglucinol permitiu maior bioacumulação de PTOX com 53,41 µg/g de raiz, sendo 1,61 vezes superior ao controle com 33,06 µg/g de raiz (TABELA 5).

Tabela 4 – Quantificação de PTOX nas raízes adventícias obtidas a partir de segmentos apicais cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de melatonina e floroglucinol, aos 40 dias.

Floroglucinol mg/L	Melatonina µM	PTOX µg/g de raiz
0	0,0	25,84 ± 0,32 e
0	0,25	24,83 ± 0,68 f
0	0,5	27,16 ± 0,65 e
0	1,0	27,37 ± 0,11 e
0	5,0	*
0	10,0	*
50	0,0	31,23 ± 0,18 d
50	0,25	32,60 ± 0,22 c
50	0,5	39,38 ± 0,42 b
50	1,0	53,54 ± 0,90 a
50	5,0	*
50	10,0	*

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott à 5% de probabilidade. *Não houve biomassa seca suficiente para a quantificação de PTOX.

Fonte: Da Autora (2023).

Tabela 5 – Quantificação de PTOX nos tratamentos que possibilitaram obtenção de maior matéria seca de raízes adventícias obtidas a partir de segmentos apicais cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de serotonina e floroglucinol, aos 40 dias.

Floroglucinol mg/L	Serotonina µM	PTOX µg/g de raiz
0	0	33,06 ± 0,51 d
0	0,25	31,79 ± 1,31 d
0	0,50	35,17 ± 0,29 c
0	1,00	32,73 ± 0,37 d
0	5,00	*
0	10,00	*
50	0	35,71 ± 1,45 c
50	0,25	20,92 ± 0,32 e
50	0,50	38,78 ± 0,24 b
50	1,00	53,41 ± 0,36 a
50	5,00	35,70 ± 0,24 c
50	10,00	*

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. *Não houve matéria seca suficiente para a quantificação de PTOX.

Fonte: Da Autora (2023).

Maior matéria seca de raízes foi encontrada no tratamento contendo 0,25 µM serotonina e 50 mg/L de floroglucinol e no meio suplementado com 0,5 µM serotonina e 50 mg/L de floroglucinol. No entanto, a adição de 50 mg/L de floroglucinol foi benéfica para a bioacumulação de PTOX, uma vez que o tratamento contendo somente 1 µM de serotonina não diferiu do controle (32,73 µg/g de raiz).

PTOX já foi detectada anteriormente nas raízes de *Hyptis suaveolens* (LAUTIÉ et al., 2008; VELÓZ et al., 2013; BALZADÚA et al., 2019; DA SILVA et al., 2022). Entretanto, ainda há a necessidade de se obter um protocolo de obtenção de PTOX como matéria-prima para a indústria farmacêutica. Porém, os resultados do presente estudo indicaram que o uso de floroglucinol, serotonina e melatonina como elicitores abióticos são capazes de melhorar a produção deste metabólito secundário nas raízes de *Hyptis suaveolens*.

4. CONCLUSÃO

O uso de 1 µM de melatonina favorece a micropropagação da *Hyptis suaveolens*, ao passo que 1 µM de melatonina ou serotonina associadas com 50 mg/L de floroglucinol aumenta a biossíntese de PTOX nas raízes de *H. suaveolens*.

REFERÊNCIAS

- ADIL, M.; ABBASI, B.H.; KHAN, T. Interactive effects of melatonin and light on growth parameters and biochemical markers in adventitious roots of *Withania somnifera* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, n. 2, p. 405-412, 2015.
- AFREEN, T.; SRIVASTAVA, P.; SINGH, H.; SINGH, J. S. Effect of invasion by *Hyptis suaveolens* on plant diversity and selected soil properties of a constructed tropical grassland. **Journal of Plant Ecology**, v. 11, n. 5, p. 751-760, 2018.
- AHMAD, I.; MUNSIF, F.; MIHOUB, A.; JAMAL, A.; SAEED, M. F.; BABAR, S.; ZIA, A. Beneficial Effect of Melatonin on Growth and Chlorophyll Content in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grown Under Salt Stress Conditions. **Gesunde Pflanzen**, p. 1-13, 2022.
- AKBARI, F.; ARMINIAN, A.; KAHRIZI, D.; FAZELI, A.; GHAHERI, M. Effect of nitrogen sources on gene expression of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) under in vitro conditions. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, n. 2, p. 11-16, 2018.
- ANDRADE, H.B.; BRAGA, A.F.; BERTOLUCCI, S.K.V.; HSIE, B.S.; SILVA, S.T.; PINTO, J.E.B.P. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in vitro plantlets. In: VI **International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants** 1155, p. 277-284, 2015.
- ANTONY CEASAR, S.; LENIN MAXWELL, S.; BHARGAV PRASAD, K.; KARTHIGAN, M.; IGNACIMUTHU, S. Highly efficient shoot regeneration of *Bacopa monnieri* (L.) using a two-stage culture procedure and assessment of genetic integrity of micropropagated plants by RAPD. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 3, p. 443-452, 2010.
- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Functions of melatonin in plants: a review. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 2, p. 133-150, 2015.
- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Melatonin promotes adventitious and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. **Journal of Pineal Research**, v. 42, n. 2, p. 147-152, 2007.
- BAZALDÚA, C.; TAKETA, A. C.; TAPIA, G. T.; DIAZ, B. C.; ARELLANO, J.; ZAPATA, E. V.; VILLARREAL, M. L. Improving the production of podophyllotoxin in hair roots of *Hyptis suaveolens* induced from regenerates plantlets. **PLoS ONE**, n. 14, v. 9, p. 1-20, 2019.
- BHATTACHARYYA, P.; KUMAR, V.; VAN STADEN, J. In vitro encapsulation based short term storage and assessment of genetic homogeneity in regenerated *Ansellia africana* (Leopard orchid) using gene targeted molecular markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 133, n. 2, p. 299-310, 2018.
- BOPANA, N.; S. SAXENA. In vitro regeneration of clonally uniform plants of *Crataeva magna*: a high value medicinal tree by axillary branching method. **New Forests**, v. 38, p. 53-65, 2009.

BUTHUC-KEUL, A. L.; DELIU, C. Clonal propagation of *Arnica montana* L., a medicinal plant. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 5, p. 581-585, 2001.

COELHO, A. D.; DE SOUZA, C. K.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTOS, G. C.; DE OLIVEIRA, T.; MARQUES, E.A.; SALIMENA, J.P.; PINTO, J. E. B. P. Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, n. 1, p. 59-74, 2021.

DA SILVA, S. T.; COELHO, A. D.; DE ASSIS, R. M. A.; DE CARVALHO, A. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. Influence of light quality and some growth regulators in inducing the production of Podophyllotoxin, a bioactive compound against cancer, in adventitious roots formed in the leaves of *Hyptis suaveolens*. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115710, 2022.

DE OLIVEIRA, T.; BALDUINO, M. C. M.; DE CARVALHO, A. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; COSSA, M. C.; COELHO, A. D.; LEITE, J. J. F.; PINTO, J. E. B. P. The effect of alternative membrane system, sucrose, and culture methods under photosynthetic photon flux on growth and volatile compounds of mint in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, n. 3, p. 529-540, 2021.

ERLAND, L.A.E; SAXENA, P. K.; MURCH, S. J. Melatonin in plant signalling and behaviour. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 2, p. 58-69, 2017.

ERLAND, L. A.; CHATTOPADHYAY, A.; JONES, A. M. P.; SAXENA, P. K. Melatonin in plants and plant culture systems: Variability, stability and efficient quantification. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1721, 2016.

ERLAND, L.A.; SAXENA, P. K. Melatonin in plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 1, p. 3-24, 2018.

FAZAL, H.; ABBASI, B.H.; AHMAD, N.; ALI, M. Exogenous melatonin trigger biomass accumulation and production of stress enzymes during callogenesis in medicinally important *Prunella vulgaris* L. (Selfheal). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 6, p.1307–1315, 2018.

GÓMEZ-PEDRAZA, D. E.; MEJÍA-MUÑOZ, J. M.; MARTÍNEZ-SOLÍS, J.; MORALES-VÁZQUEZ, B. Morphogenetic variation in the multiplication and rooting in vitro of wild clones of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*). In: **XIII International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials 1237**, p. 243-250, 2019.

HERNANDEZ-RUIZ, J.; CANO, A.; ARNAO, M. B. Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. **Planta**, v. 220, n. 1, p. 140-144, 2004.

HOSSAN, M. S.; JINDAL, H.; MAISHA, S.; RAJU, C. S.; SEKARAN, S.; NISSAPATORN, V.; KAHARUDIN, F.; YI, L. S.; KHOO, T. J.; RAHMATULLAH, M.; WIART, C. Antibacterial effects of 18 medicinal plants used by the Khyang tribe in Bangladesh. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n.1, p. 201-208, 2018.

JYOTI, J. **Micropropagation of Hazelnut (*Corylus Species*)** (Doctoral dissertation, University of Guelph). 2013.

KAMAL, A.; ALI HUSSAINI, S. M.; RAHIM, A.; RIYAZ, S. Podophyllotoxin derivatives: A patent review (2012–2014). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 25, n. 9, p. 1025-1034, 2015.

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**, n. 3, v. 9, p. 290-298, 2018.

LAUTIÉ, E.; VILLARREAL, M. L.; FLINIAUX, M. A. *Hyptis suaveolens*, an alternative source of podophyllotoxin? **Planta Medica**, n. 9, v. 74, p. 1106-1115, 2008.

LERIN, J.; RIBEIRO, Y. R. D. S.; DE OLIVEIRA, T. D. R.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. Histomorphology and proteomics during rooting of in vitro shoots in *Cariniana legalis* (Lecythidaceae), a difficult-to-root endangered species from the Brazilian Atlantic Forest. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 144, n. 2, p. 325-344, 2021.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n. 3, 473–497, 1962.

MURCH, S. J.; CAMPBELL, S.S.B; SAXENA, P. K. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 6, p. 786-793, 2001.

MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Melatonin: a potential regulator of plant growth and development? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 6, p. 531-536, 2004.

PELAGIO-FLORES, R.; ORTÍZ-CASTRO, R.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; LÓPEZ-BUCIO, J. Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 3, p. 490-508, 2011.

PTAK, A.; SIMLAT, M.; MORĄŃSKA, E.; SKRZYPEK, E.; WARCHOŁ, M.; TARAKEMEH, A.; LAURAIN-MATTAR, D. Exogenous melatonin stimulated Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis in in vitro cultures of *Leucojum aestivum* L. **Industrial Crops and Products** v. 138, n. 111458, 2019.

QIAN LIU, Y.; YANG, L.; TIAN, X. Podophyllotoxin: current perspectives. **Current Bioactive Compounds**, v. 3, n.1, p. 37-66, 2007.

QIAO, Y.; YIN, L.; WANG, B.; KE, Q.; DENG, X.; WANG, S. Melatonin promotes plant growth by increasing nitrogen uptake and assimilation under nitrogen deficient condition in winter wheat. **Plant, Physiology and Biochemistry**, v.139, p. 342–349, 2019.

RAVISHANKAR, G. A.; RAMAKRISHNA, A. **Serotonin and melatonin: their functional role in plants, food, phytomedicine, and human health.** CRC Press, 2016, 596 p.

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. D. O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, n. 1, p. 69-102, 2017.

ROCHA, T. T.; ARAÚJO, D. X.; DA SILVA, A. M.; DE OLIVEIRA, J. P. V.; DE CARVALHO, A. A.; GAVILANES, M. L.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J. E. B. P. Morphoanatomy and changes in antioxidant defense associated with the natural ventilation system of micropropagated *Lippia dulcis* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, p. 1-15, 2022.

SHARIFIAN, S.; VAHDATI, K.; MIRMASOUMI, M.; GHAEM MAGHAMI, S. A. Assessment of phloroglucinol effect on rooting of tissue cultured *Persian walnut*. In: **III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants 812**. p. 189-196, 2007.

SHARMA, J.; GAIROLA, S.; SHARMA, Y. P.; GAUR, R. D. Ethnomedicinal plants used to treat skin diseases by Tharu community of district Udham Singh Nagar, Uttarakhand, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.158, n.1, p.140-206, 2014.

SUJATHA, M.; DINESH KUMAR, V. In vitro bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary buds. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 4, p. 782-786, 2007.

TAN, S.N.; TEE, C.S.; WONG, H.L. Multiple shoot bud induction and plant regeneration studies of *Pongamia pinnata*. **Plant Biotechnology**, p. 18.0711 a, 2018.

TCHOUGA, A. O.; DEBLAUWE, V.; DJABOU, S. A. M.; FORGIONE, G.; HANNA, R.; NIEMENAK, N. Micropropagation and effect of phloroglucinol on rooting of *Diospyros crassiflora* Hiern. **HortScience**, v. 55, n. 4, p. 424-428, 2020.

ULLAH; M.A.; TUNG MUNNITHUM, D.; GARROS, L.; DROUET, S.; HANO, C.; ABBASI, B.H. Effect of Ultraviolet-C radiation and melatonin stress on biosynthesis of antioxidant and anti-diabetic metabolites produced in in vitro callus cultures of *Lepidium sativum* L. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n.7, p.1787, 2019.

VÉLOZ, R. A.; TAKETA, A. C.; VILLARREAL, M. L. production of podophyllotoxin from roots and plantlets of *Hyptis suaveolens* cultivated *in vitro*. **Pharmacognos Research**, n. 5, v. 2, p. 93-102, 2013.

XU, L.; CHENG, F.; ZHONG, Y. Micropropagation of *Paeonia ostii'feng* dan'via in vitro mature embryo culture. **Propagation of ornamental plants**, v. 21, n. 3, p. 78-87, 2021.

ZHAO, L.; TIAN, X.; FAN, P.C.; ZHAN, Y.J.; SHEN, D.W.; JIN, Y. Separation, determination and identification of the diastereoisomers of podophyllotoxin and its esters by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1210, n. 2, p.168-177, 2008.

**ARTIGO 2 - ELICITORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA CULTURA DE RAÍZES
DE *Hyptis suaveolens* (L.) POIT**

**ARTICLE 2 - BIOTIC AND ABIOTIC ELICITORES ON ROOT CULTURE OF
Hyptis suaveolens (L.) POIT**

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

RESUMO

Hyptis suaveolens (Lamiaceae), conhecida popularmente como “bamburral” e “cheirosa”, contém podofilotoxina (PTOX) em suas raízes, lignana utilizada pela indústria farmacêutica na fabricação de medicamentos para tratamento de alguns tipos de câncer. A cultura de raízes de plantas medicinais é uma ferramenta empregada na obtenção de metabólitos secundários de forma sustentável. Desta forma, objetivou-se avaliar o uso de diferentes elicitores bióticos e abióticos na produção de PTOX em cultura de raízes de *H. suaveolens*. Raízes de plântulas micropropagadas de *H. suaveolens* (400 mg) foram inseridas em erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura MS e seis diferentes elicitores: qualidade de luz, melatonina, serotonina, metil-jasmonato, ácido salicílico e quitosana. Os erlenmeyers foram encaminhados para sala de crescimento (25 °C) e colocados em shaker (100 r.p.m.) ao abrigo da luminosidade (exceto ao avaliar as diferentes qualidades de luz). Cada elicitor foi avaliado separadamente, totalizando 6 experimentos. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo 5 tratamentos em cada experimento com 4 repetições. Após 42 dias, avaliou-se o acúmulo de biomassa e a produção de PTOX nas raízes e no meio de cultura, caracterizada e quantificada nas raízes por UHPLC-UVMS/MS e HPLC-DAD. Os melhores resultados quanto ao acúmulo de biomassa nas raízes foram observados nos tratamentos com LED azul, 50 mg/L de quitosana, 10 µM de melatonina, 30 µM de serotonina, 5 e 10 mM de metil-jasmonato e 25 mM de ácido salicílico. A produção de PTOX foi favorecida com uso de 100 mg/L de quitosana, 30 µM de melatonina, 10 µM de serotonina e 10 mM de metil-jasmonato. Independente do elicitor, a maior produção de PTOX foi observada no meio de cultura. O uso de elicitores aumenta a produção de PTOX via cultura de raízes de *H. suaveolens*.

Palavras-chave: Melatonina. Serotonina. Metil-jasmonato. Quitosana. Ácido salicílico. LED.

ABSTRACT

Hyptis suaveolens (Lamiaceae), popularly known as “bamburral” and “cheirosa”, contains podophyllotoxin (PTOX) in its roots, a lignan used by the pharmaceutical industry in the manufacture of drugs for the treatment of some types of cancer. The cultivation of roots of medicinal plants is a tool used to obtain secondary metabolites in a sustainable way. Thus, the objective was to evaluate the use of different biotic and abiotic elicitors in the production of PTOX in *H. suaveolens* root cultures. Roots of micropropagated *H. suaveolens* seedlings (400 mg) were placed in flasks containing 50 mL of MS culture medium and six different elicitors: light quality, melatonin, serotonin, methyl jasmonate, salicylic acid and chitosan. The Erlenmeyer flasks were taken to a growth room (25 °C) and placed in a shaker (100 r.p.m.) away from light (except when evaluating the different light qualities). Each elicitor was evaluated separately, totaling 6 experiments. A completely randomized design (DIC) was used, with 5 treatments in each experiment with 4 replications. After 42 days, the accumulation of biomass and the production of PTOX in the roots and in the culture medium were evaluated, characterized and quantified in the roots by UHPLC-UVMS/MS and HPLC-DAD. The best results regarding the accumulation of biomass in the roots were observed in the treatments with blue LED, 50 mg/L of chitosan, 10 µM of melatonin, 30 µM of serotonin, 5 and 10 mM of methyl jasmonate and 25 mM of salicylic acid. The production of PTOX was favored with the use of 100 mg/L of chitosan, 30 µM of melatonin, 10 µM of serotonin and 10 mM of methyl jasmonate. Regardless of the elicitor, the highest PTOX production was observed in the culture medium. The use of elicitors increases PTOX production via *H. suaveolens* root culture.

Keywords: Melatonin. Serotonin. Methyl jasmonate. Chitosan. Salicylic acid. LED.

1. INTRODUÇÃO

Hyptis suaveolens (L.) Poit (sinonímia: *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze), espécie medicinal pertencente à família Lamiaceae, é popularmente utilizada no tratamento de inflamações, infecções, reumatismo e cólicas (RIBEIRO et al., 2017; HOSSAN et al., 2018; SHARMA et al., 2014). Estudos reportaram atividade bioherbicida, inseticida, repelente de insetos, fungicida, nematicida e bactericida da espécie (ADJOU; CHOUGOUROU; SOUMANOU, 2019; SONIBARE et al., 2015; PANDEY et al., 2012; AGBENIN, 2014; JAYA et al., 2011). Além disso, suas raízes contêm podofilotoxina (PTOX), lignana utilizada no tratamento de verrugas genitais causadas pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) e como matéria-prima para medicamentos empregados no tratamento do câncer (VÉLOZ et al., 2013; DA SILVA et al., 2022; KUMARI et al., 2016).

A produção de PTOX se dá principalmente pela coleta de plantas do gênero *Podophyllum*, levando espécies à ameaça de extinção (CHAUDHARI et al., 2014). Além disso, a síntese química de PTOX é um processo caro. Assim, pesquisadores vêm buscando formas alternativas para a produção deste metabólito secundário, sendo a cultura de tecidos vegetais apontada como uma alternativa sustentável de obtenção de PTOX (DA SILVA et al., 2022; KAŠPAROVÁ et al., 2018; SINGH; DWIVEDI, 2018; SEDIGHEH et al., 2012; LAUTIÉ; VILLARREAL; FLINIAUX, 2008).

A cultura de raízes de espécies que já produzem os metabólitos secundários de interesse é uma das ferramentas da biotecnologia vegetal para a produção *in vitro* de PTOX, assim como a suspensão de células, cultura de calos, raízes adventícias e *hairy roots*. Estudos reportaram o sucesso do uso da cultura de tecidos na obtenção de PTOX nas espécies *Linum album* (YOUSEFZADI et al., 2010), *Juniperus virginiana* (KAŠPAROVÁ et al., 2018), *Podophyllum peltatum* (ANBAZHAGAN et al., 2008), *Podophyllum hexandrum* (HAZRA et al., 2017) e *Hyptis suaveolens* (DA SILVA et al., 2022; VÉLOZ et al., 2013). Entretanto, ainda são necessários estudos mais aprofundados com relação à produção de PTOX a partir da cultura de tecidos de *H. suaveolens*.

Elicitores podem ser adicionados ao meio de cultura para estimular a produção de metabólitos secundários de importância econômica *in vitro* (SINGH; DWIVEDI, 2018). Na literatura, existem relatos do aumento da bioacumulação da PTOX utilizando ácido salicílico (YOUSEFZADI et al., 2010; KAŠPAROVÁ et al., 2018), metil-jasmonato (FÜRDEN et al., 2005; ANBAZHAGAN et al., 2008), diferentes qualidades de luz (DA SILVA et al., 2022; YOUSEFZADI et al., 2012) e quitosana (SEDIGHEH et al., 2012; SEDIGHEH et al., 2013).

Entretanto, não há estudos na literatura disponível avaliando o efeito do uso da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) e serotonina (5-hidroxitriptamina) no acúmulo *in vitro* de PTOX. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos elicitores bióticos e abióticos na cultura de raízes de *H. suaveolens*, com foco no efeito da qualidade de luz, quitosana, ácido salicílico, metil-jasmonato, melatonina e serotonina no acúmulo de biomassa das raízes e produção de PTOX *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Plantas-matrizes de *Hyptis suaveolens* para coleta de sementes foram cultivadas em casa-de-vegetação no Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Lavras (Lavras, Minas Gerais). As exsiccatas foram depositadas no Herbário ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da UFLA), sob o registro 20475 e Herbário SPF (Herbário da Universidade de São Paulo) com nome de coleta H.B. Andrade 1 (SPF).

2.2. Condições gerais dos experimentos

Sementes da *H. suaveolens* foram coletadas e tiveram sua mucilagem previamente retirada utilizando cal virgem (2 g em 50 mL). Posteriormente, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo) sob agitação constante por 15 min, seguido de tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semissólido (5,5 g/L de ágar) suplementado com 30 g/L de sacarose. O pH foi ajustado em $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a 121 °C, por 20 min. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h, temperatura de 25 ± 1 °C e sob lâmpadas fluorescentes branca-frias ($69 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Após 40 dias, as raízes foram utilizadas para a montagem dos experimentos.

Em câmara de fluxo laminar, 400 mg de raízes foram excisados com auxílio de um bisturi e pesados com balança de precisão em condições assépticas. Em seguida, as raízes foram inoculadas em Erlenmeyer contendo 50 mL em meio de cultura MS e diferentes elicitores. Os Erlenmeyer foram mantidos em shaker (100 r.p.m) em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C. Após 42 dias, os experimentos foram avaliados quanto à matéria fresca e seca das

raízes iniciais (MFR_i e MSR_i) e finais (MFR_f e MSR_f), índice de crescimento da matéria fresca ($ICMF = \text{Matéria fresca raiz final (MFR}_f) - \text{Matéria fresca raiz inicial (MFR}_i) / MFR_i$) e seca de raiz ($ICMS = \text{Matéria seca raiz final (MSR}_f) - \text{Matéria seca raiz inicial (MSR}_i) / MSR_i$) e produção de PTOX nas raízes e no meio de cultura.

Após 42 dias, as raízes tiveram sua matéria fresca (MFR_f) e seca (MSR_f) quantificadas em balança de precisão. O meio de cultura foi separado das raízes e ambos foram mantidos em freezer (-80 °C). As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais na Universidade Federal de Lavras para quantificação da PTOX em caixa térmica.

2.3. Elicitores bióticos e abióticos no acúmulo de biomassa de raízes e produção de PTOX na cultura de raízes de *Hyptis suaveolens*

Os experimentos foram realizados separadamente utilizando se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos e 5 repetições, sendo 1 Erlenmeyer por repetição.

2.3.1. Qualidade de luz

As raízes foram cultivadas sob quatro regimes de qualidades de luz: LED vermelho, LED azul, LED branco e no escuro (controle) por 42 dias.

2.3.2. Quitosana

As raízes foram cultivadas no escuro por 42 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de quitosana: 0; 50; 100 e 150 mg/L.

2.3.3. Melatonina

As raízes foram cultivadas no escuro por 42 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de melatonina: 0; 10; 30 e 100 μM . A solução-estoque (1 mM) de melatonina (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ de pureza) foi previamente preparada por diluição em etanol 92° GL. Diferentes alíquotas de melatonina foram adicionadas ao meio de cultura após autoclavagem, em câmara de fluxo laminar com auxílio de seringa e membrana (0,22 μm).

2.3.4. Serotonina

Raízes foram cultivadas no escuro por 42 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de serotonina: 0; 10; 30 e 100 μM . A solução-estoque (1 mM) de serotonina

(Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ de pureza) foi previamente preparada por diluição em água destilada. Serotonina foi adicionada ao meio de cultura MS após autoclavagem, em câmara de fluxo laminar, sendo previamente filtrada em membrana de 0,22 μm .

2.3.5. Metil-Jasmonato

As raízes foram cultivadas no escuro por 42 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de metil-jasmonato (MeJa): 0; 5; 10 e 20 mM. O preparo da solução-estoque foi realizado diluindo o MeJa inicialmente em etanol anidro (99,8% P.A.) e, em seguida, diluiu-se em água destilada até a concentração de 1 mM.

2.3.6. Ácido salicílico

As raízes foram cultivadas no escuro por 42 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ácido salicílico: 0; 25; 50 e 100 mM. A solução-estoque foi previamente preparada diluindo o ácido salicílico em álcool etílico anidro (99,8% P.A.) e posteriormente completando o volume com água destilada até a concentração de 1 mM.

2.4. Análises de crescimento

2.4.1. Acúmulo de biomassa nas raízes

Após 42 dias, as raízes foram separadas do meio de cultura por filtração à vácuo e foram pesadas em balança de precisão, para obtenção da matéria fresca das raízes (MFR_f). Em seguida, foram acondicionadas em sacos de papel kraft e encaminhadas para secagem em estufa de circulação de ar forçado, a 37 °C por 72 horas. As raízes foram novamente pesadas para obtenção da matéria seca das raízes (MSR_f).

2.4.2. Índice de crescimento da matéria fresca e seca

Para o cálculo de índices de crescimento de matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS), pesou-se 400 mg de raízes do mesmo lote de plântulas utilizadas nos experimentos (MFR_i). Após a secagem obteve-se o valor da MSR_i , em cada experimento.

2.5. Análises de podofilotoxina (PTOX)

A preparação das amostras de raízes seguiu a metodologia descrita por Da Silva et al. (2022), conforme resumidamente descrita no item 2.5.1., do artigo 1. O preparo das amostras do meio de cultura também seguiu a metodologia de Da Silva et al. (2022). Em síntese, o meio

de cultura mantido em freezer à -18 °C, foi descongelado ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. À 1 mL do meio de cultura foi adicionado 500 µL de clorofórmio. Em seguida, os microtubos foram agitados em vórtex (1 min) e centrifugados a 10.000 rpm por 5 min. A fase aquosa foi descartada com pipeta de Pasteur e a fase clorofórmica foi concentração a temperatura ambiente. Após completa evaporação do clorofórmio, adicionou-se 250 µL de metanol grau HPLC, seguido de agitação em vórtex (30 s). O sobrenadante foi injetado automaticamente em sistema de cromatografia líquida.

A caracterização da presença de PTOX nas amostras e a quantificação foram realizadas conforme descrito nos itens 2.5.2. e 2.5.3. do artigo 1, respectivamente.

2.6. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software R. Os gráficos foram criados no software GraphPad Prism.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Qualidade de luz

Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o uso de diferentes qualidades de luz (TABELA 1 e FIGURA 1). A cultura de raízes realizada sob lâmpadas LED azul proporcionou melhores valores de matéria fresca de raiz (1040 mg) e índice de crescimento de matéria fresca (1,61). Entretanto, o comprimento de onda da luz vermelha induziu maior acúmulo de matéria seca nas raízes (61,56 mg) e índice de crescimento de matéria seca (3,98) (TABELA 1). Diferentes comprimentos de onda emitidos pelas lâmpadas LED influenciam o crescimento, desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários de plantas medicinais (LAZZARINI et al., 2018; DA SILVA et al., 2022; COELHO et al., 2021; ALVARENGA et al., 2015; ANDRADE et al., 2015; HSIE et al., 2019).

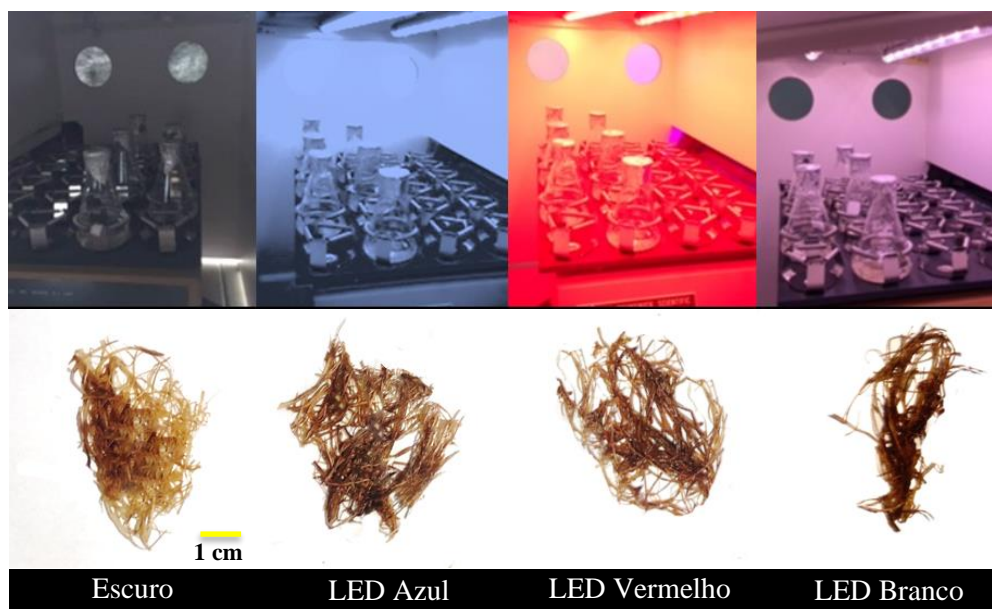
Tabela 1- Matéria fresca (MFR_i) e seca (MSR_i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR_f) e seca (MSR_f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* por 42 dias em diferentes qualidades de luz.

Qualidade de luz	MFR_i (mg)	MSR_i (mg)	MFR_f (mg)	MSR_f (mg)	ICMF	ICMS
Escuro	400	12,36	810 d	35,70 c	1,05 d	1,89 d
Azul	400	12,36	1040 a	45,52 b	1,61 a	2,73 b
Vermelho	400	12,36	950 b	61,56 a	1,38 b	3,98 a
Branco	400	12,36	900 c	42,36 b	1,25 c	2,43 c

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

Observou-se que as raízes do tratamento LED vermelho eram mais grossas e acumularam mais biomassa seca (61,56 mg) em relação aos outros tratamentos (TABELA 1). Além disso, as raízes do tratamento com LED Branco ficaram mais escuras. Provavelmente o contato com a luz branca levou à oxidação das raízes, ao passo que levou à degradação das moléculas de PTOX (TABELA 2).

Figura 1- Raízes frescas de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* por 42 dias em diferentes regimes de luz (escuro, LED azul, vermelho e branco).



A maior produção de PTOX (46,07 $\mu\text{g/g}$) foi observada nas raízes cultivadas sob luz azul (TABELA 2). Entretanto, o espectro da luz vermelha induziu maior acúmulo de PTOX no

meio de cultura (0,23 µg/mL), se destacando quanto a produção de PTOX total no meio (11,66 µg) e PTOX total no tratamento (raiz + meio; 13,32 µg) (TABELA 2).

Tabela 2- Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; µg/g), no meio de cultura (PTOX meio; µg/mL), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; µg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; µg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); µg) para a espécie *Hyptis suaveolens* em diferentes qualidades de luz, por 42 dias.

Qualidade de luz	PTOX raiz (µg/g)	PTOX meio (µg/mL)	Total PTOX Raiz (µg)	Total PTOX Meio (µg)	PTOX total (raiz +meio) (µg)
Escuro	24,97 b	0,19 b	0,97 c	9,67 b	10,64 c
Azul	46,07 a	0,20 b	2,30 a	9,83 b	12,14 b
Vermelho	24,33 b	0,23 a	1,66 b	11,66 a	13,32 a
Branco	0 c	0 c	0 d	0 c	0 d

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

Da Silva et al (2022) reportaram a produção de PTOX em raízes adventícias advindas de folhas de *Hyptis suaveolens* cultivadas no escuro (10,72 µg/g) e sob lâmpadas LED vermelhas (9,93 µg/g). No presente estudo não houve diferença significativa entre os valores de PTOX na raiz para o cultivo no escuro (24,97 µg/g) e sob LED vermelho (24,33 µg/g). A grande diferença no acúmulo de PTOX entre os dois estudos com *H. suaveolens* ocorre devido ao explante inicial utilizado. Resultados semelhantes foram observados por Yousefzadi et al (2012), onde a luz vermelha aumentou a produção de PTOX em suspensão de células de *Linum album* pelo aumento da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e na expressão de genes envolvidos na biossíntese de PTOX, como os genes PAL e cinamoil-CoA redutase (CCR). Além disso, a luz azul também aumentou a produção de PTOX, sendo associado a maior expressão dos genes CCR e pinosresinol/laricresinol reductase (PLR) em *L. album* (YOUSEFZADI et al., 2012). A alta energia contida no comprimento de onda da luz azul (400-500 nm) pode promover o aumento da biossíntese de compostos fenólicos e lignanas (GHIMIRE et al., 2017; SZOPA; EKIERT, 2016).

3.2. Quitosana

Observou-se diferença estatisticamente significativa nos tratamentos contendo diferentes concentrações de quitosana no meio de cultura ($p < 0,05$) (TABELA 3, FIGURA 2). De modo geral, os melhores resultados quanto ao acúmulo de biomassa e índices de crescimento

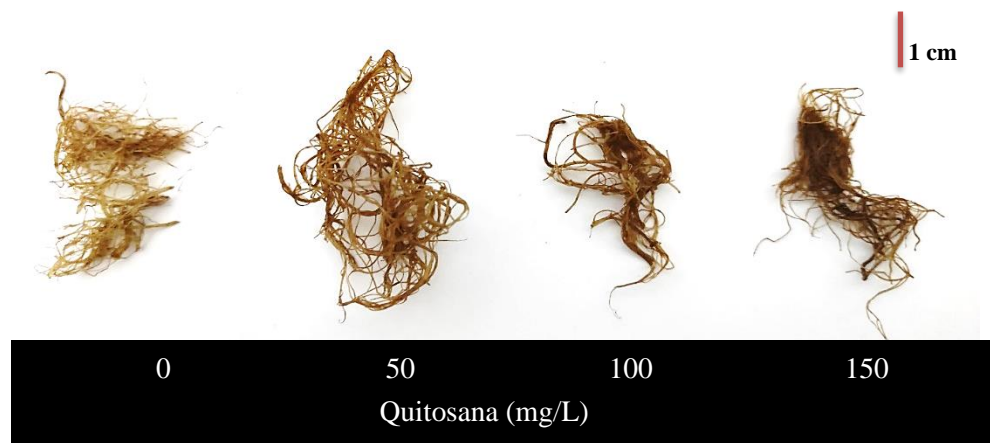
foram observados no tratamento suplementado com 50 mg/L de quitosana (TABELA 3). A elicitação com quitosana promoveu o aumento da produção de raízes *in vitro* da espécie *Withania somnifera* (SIVANANDHAN et al., 2012). Além disso, o uso de 5 e 15 mg/L de quitosana aumentou a biomassa seca e fresca de plântulas de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Agria) micropropagadas (ASGHARI-ZAKARIA; MALEKI-ZANJANI; SEDGHI, 2009).

Tabela 3- Matéria fresca (MFR_i) e seca (MSR_i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR_f) e seca (MSR_f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de quitosana.

Quitosana (mg/L)	MFR _i (mg)	MSR _i (mg)	MFR _f (mg)	MSR _f (mg)	ICMF	ICMS
0	400	13,41	770 d	36,58 c	0,92 d	1,71 c
50	400	13,41	1010 a	47,70 a	1,51 a	2,53 a
100	400	13,41	970 b	46,24 a	1,41 b	2,40 a
150	400	13,41	860 c	42,52 b	1,16 c	2,15 b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

Figura 2- Raízes frescas de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de quitosana (0, 50, 100 e 150 mg/L).



A adição de quitosana no meio de cultura inibiu a biossíntese de PTOX na raiz (TABELA 4), destacando-se o tratamento com 0 mg/L com acúmulo de 23,05 µg/g de PTOX na raiz (TABELA 4). Entretanto, a suplementação com 50 e 100 mg/L do elicitor promoveu um aumento de 2,1 vezes na produção de PTOX no meio de cultura em relação ao controle. Observando somente a PTOX total encontrada nas raízes de *H. suaveolens* por tratamento (Total PTOX Raiz), a adição de 50 mg/L de quitosana foi superior aos outros tratamentos (1,05

µg). Além disso, os tratamentos contendo 50 e 100 mg/L de quitosana apresentaram maiores valores de PTOX total no meio de cultura em cada tratamento (28,00 e 28,83 µg, respectivamente) e PTOX total (raiz + meio de cultura) sendo observados 29,06 e 29,60 µg de PTOX, respectivamente.

Tabela 4- Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; µg/g), no meio de cultura (PTOX meio; µg/mL), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; µg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; µg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); µg) para a espécie *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de quitosana.

Quitosana (mg/L)	PTOX raiz (µg/g)	PTOX meio (µg/mL)	Total PTOX Raiz (µg)	Total PTOX Meio (µg)	PTOX total (raiz +meio) (µg)
0	23,05 a	0,27 c	0,92 b	13,50 c	14,42 c
50	21,10 b	0,56 a	1,05 a	28,00 a	29,06 a
100	15,36 d	0,58 a	0,77 c	28,83 a	29,60 a
150	17,21 c	0,47 b	0,69 d	23,33 b	24,02 b

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

A quitosana é um biopolímero amplamente estudado por sua capacidade de aumentar a biossíntese de proteínas relacionadas à produção de compostos relacionados à defesa das plantas contra patógenos, incluindo a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), precursora da rota metabólica dos compostos fenólicos e lignanas (KATIYAR; HEMANTARANJAN; SINGH, 2015; FERRI; TASSONI, 2011). A eliciação com 100 mgq/L de quitosana dobrou o acúmulo de PTOX em culturas de células de *Linum album*, em relação ao tratamento controle (SEDIGHEH et al., 2012). Esse acréscimo na produção de PTOX pode estar relacionado ao aumento da expressão dos genes relacionados à via de biossíntese dos fenilpropanóides, lignanas como os genes PAL e CCR (SEDIGHEH et al., 2013; AHMAD et al., 2019).

3.3. Melatonina

Diferença estatisticamente significativa no acúmulo de matérias fresca e seca das raízes ($p < 0,05$) foi observada nos tratamentos contendo diferentes concentrações de melatonina (TABELA 5 e FIGURA 3). De modo geral, o uso de 10 µM da melatonina aumentou a matéria fresca final (MFR_f e MSR_f) e seca de raízes em 1,45 e 1,64 vezes em relação ao controle, respectivamente (TABELA 5). Concentrações de 30 e 100 µM reduziram o acúmulo de

biomassa nas raízes (MFR_f e MSR_f) e os índices de crescimento de matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) em relação a concentração de $10 \mu\text{M}$ (TABELA 5).

Tabela 5- Matéria fresca (MFR_i) e seca (MSR_i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR_f) e seca (MSR_f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de melatonina.

Melatonina (μM)	MFR_i (mg)	MSR_i (mg)	MFR_f (mg)	MSR_f (mg)	ICMF	ICMS
0	400	12,65	820 b	35,86 b	1,06 d	1,79 c
10	400	12,65	1190 a	58,70 a	1,97 a	3,63 a
30	400	12,65	850 b	40,60 b	1,12 c	2,38 b
100	400	12,65	870 b	39,34 b	1,17 b	2,08 b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

Observou-se que o cultivo *in vitro* nas concentrações de 30 e $100 \mu\text{M}$ induziram um maior escurecimento das raízes. A concentração de melatonina é bastante variável quanto às espécies estudadas, sendo observado resultados positivos em altas concentrações de $600 \mu\text{M}$ para *Withania somnifera* (ADIL et al., 2015) e baixas concentrações, como em *Hypericum perforatum*, na qual foi observado respostas efetivas no enraizamento com a adição de $5 \mu\text{M}$ (MURCH; SAXENA, 2004).

A maior produção de PTOX foi observada no cultivo contendo $30 \mu\text{M}$ de melatonina com um acúmulo de $38,25 \mu\text{g/g}$ na raiz e no meio de cultura de $0,54 \mu\text{g/mL}$ e o rendimento total de PTOX na raiz e no meio de cultura (50 mL) foi $28,69 \mu\text{g}$, sendo 2,75 vezes superior ao controle (TABELA 6). Entretanto, observou-se maior acúmulo de PTOX na raiz no meio suplementado com $10 \mu\text{M}$ de melatonina ($1,65 \mu\text{g}$) (TABELA 6).

Figura 3 - Raízes frescas de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de melatonina (0, 10, 30 e $100 \mu\text{M}$).



Até o momento, não foram encontrados estudos que tivessem reportado o efeito da melatonina no acúmulo de PTOX em raízes de *H. suaveolens*. Entretanto, a melatonina tem sido estudada quanto ao seu efeito de promoção do enraizamento das plantas e crescimento vegetal (MURCH et al., 2001; MURCH; SAXENA, 2002; ERLAND et al., 2017; ERLAND; SAXENA, 2018). Além disso, a melatonina possui estrutura e efeitos semelhantes à auxina (ERLAND et al., 2016; HERNANDEZ-RUIZ et al., 2004; ARNAO; HERNANDEZ-RUIZ, 2017). A adição de 100 μM e 200 μM melatonina no meio de cultura de MS aumentou a produção de compostos fenólicos em calos derivados de folhas de *Ocimum basilicum*, sendo o ácido rosmarínico o componente majoritário (DURAN; KILIC; COSKUN, 2019).

Tabela 6- Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; $\mu\text{g/g}$), no meio de cultura (PTOX meio; $\mu\text{g/mL}$), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; μg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; μg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); μg) para a espécie *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de melatonina.

Melatonina (μM)	PTOX raiz ($\mu\text{g/g}$)	PTOX meio ($\mu\text{g/mL}$)	Total PTOX Raiz (μg)	Total PTOX Meio (μg)	PTOX total (raiz +meio) (μg)
0	19,30 d	0,19 d	0,77 d	9,66 d	10,43 d
10	27,49 c	0,28 c	1,65 a	14,17 c	15,82 c
30	38,25 a	0,54 a	1,52 b	27,17 a	28,69 a
100	33,36 b	0,44 b	1,33 c	22,16 b	23,49 b

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

Ainda, a melatonina está ligada à regulação de enzimas relacionadas ao metabolismo e assimilação de nitrogênio, macronutriente relacionado ao aumento de produção de PTOX em suspensão de células de *P. hexandrum* (QIAO et al., 2019; CHATTOPADHYAY et al., 2003).

3.4. Serotonina

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos com diferentes concentrações de serotonina (TABELA 7 e FIGURA 4). O meio suplementado com serotonina induziu maior crescimento do explante, onde a elicitação com 30 μM de promoveu maior produção de biomassa fresca (1660 mg) e seca (51,14 mg), assim com os melhores índices de crescimento (ICMF=3,15; ICMS=2,97).

Tabela 7- Matéria fresca (MFR_i) e seca (MSR_i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR_f) e seca (MSR_f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de serotonina.

Serotonina (μM)	MFR _i (mg)	MSR _i (mg)	MFR _f (mg)	MSR _f (mg)	ICMF	ICMS
0	400	12,89	940 d	26,01 d	1,35 d	1,02 d
10	400	12,89	1330 b	42,18 b	2,34 b	2,27 b
30	400	12,89	1660 a	51,14 a	3,15 a	2,97 a
100	400	12,89	1150 c	36,38 c	1,87 c	1,82 c

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

Figura 4 - Raízes frescas de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de serotonina (0, 10, 30 e 100 μM).



O meio suplementado com a concentração mais alta de serotonina (100 μM) inibiu o crescimento de *H. suaveolens* (TABELA 7). Pelágio-Flores et al (2011) reportaram um aumento de 2 vezes no desenvolvimento de raízes adventícias de plântulas de *Arabidopsis thaliana* quanto tratadas com 150 a 600 μM de serotonina. Entretanto, as concentrações de serotonina que promovem o enraizamento são específicas para cada espécie.

O meio suplementado com serotonina induziu maior crescimento de raízes até 30 μM, no entanto, esta dose inibiu a síntese de PTOX. O maior acúmulo de PTOX foram observados no tratamento contendo 10 μM de serotonina (TABELA 8). O meio de cultura com 10 μM da indolamina possibilitou o aumento de 2,4 vezes na produção total de PTOX (meio + raiz) em relação ao controle (TABELA 8).

Tabela 8- Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; $\mu\text{g/g}$), no meio de cultura (PTOX meio; $\mu\text{g/mL}$), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; μg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; μg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); μg) para a espécie *Hyptis suaveolens* cultivadas no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de serotonina.

Serotonina (μM)	PTOX raiz ($\mu\text{g/g}$)	PTOX meio ($\mu\text{g/mL}$)	Total PTOX Raiz (μg)	Total PTOX Meio (μg)	PTOX total (raiz +meio) (μg)
0	18,69 d	0,19 c	0,56 c	9,67 c	10,23 c
10	53,24 a	0,45 a	2,13 a	22,50 a	24,63 a
30	34,94 c	0,17 c	1,75 b	8,67 c	10,42 c
100	43,01 b	0,23 b	1,72 b	11,50 b	13,22 b

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

A molécula de serotonina é derivada o triptofano, sendo capaz de influenciar o enraizamento e desenvolvimento da parte aérea em algumas espécies (MURCH; SAXENA, 2002). Além disso, a serotonina endógena está relacionada com a capacidade das plantas de lidar com estresses bióticos e abióticos, atuando na produção de compostos fenólicos pela via biossintética dos fenilpropanóides, mesma via de biossíntese das lignanas (ERLAND; TURI; SAXENA, 2019).

3.5. Metil-jasmonato

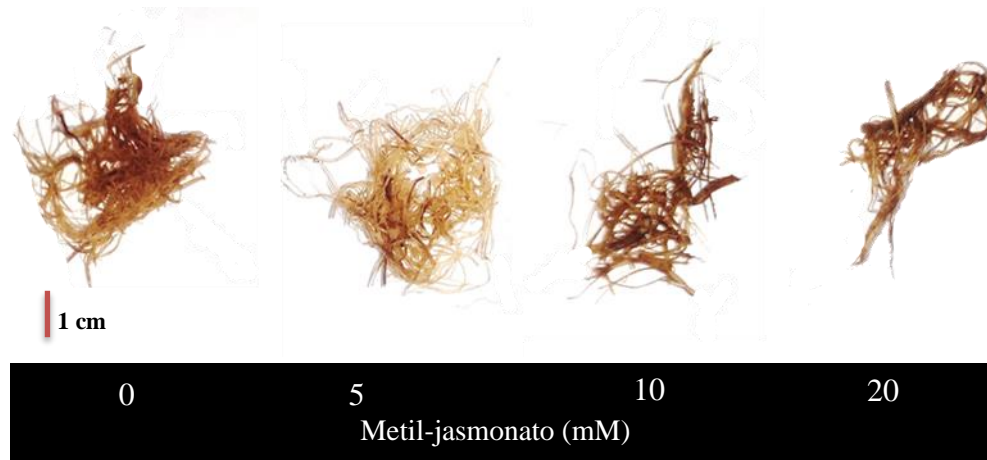
As concentrações de metil-jasmonato afetaram o crescimento das raízes *in vitro* (TABELA 9 e FIGURA 5). A suplementação no meio de cultura com 5 mM de MeJa induziram maior acúmulo de matéria fresca de raiz (MFR_f), matéria seca (MSR_f), índice de crescimento de matéria fresca (ICMF) e de matéria seca (ICMS) (TABELA 9).

Tabela 9 - Matéria fresca (MFR_i) e seca (MSR_i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR_f) e seca (MSR_f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de metil-jasmonato.

Metil-jasmonato (mM)	MFR_i (mg)	MSR_i (mg)	MFR_f (mg)	MSR_f (mg)	ICMF	ICMS
0	400	14,10	860 c	34,76 b	1,14 c	1,37 b
5	400	14,10	940 a	42,02 a	1,35 a	1,87 a
10	400	14,10	950 a	34,84 b	1,38 a	1,38 b
20	400	14,10	880 b	36,02 b	1,20 b	1,46 b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

Figura 5 - Raízes frescas de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de metil-jasmonato (0, 5, 10 e 20 mM).



A adição de 5 mM de MeJa se destacou quanto a produção de PTOX nas raízes (39,91 $\mu\text{g/g}$ PTOX), aumentando em 1,62 vezes a PTOX na raiz em relação ao tratamento sem adição do elicitor (TABELA 10). O uso de 10 mM do elicitor (0,48 $\mu\text{g/mL}$) aumentou a concentração de PTOX no meio de cultura em 2,1 vezes em relação ao controle (0,23 $\mu\text{g/mL}$). O volume do meio por frasco foi de 50 mL o que correspondeu a um total de 24,09 μg . A produção de PTOX na raiz e no meio foi de 24,86 μg sendo 1,88 vezes maior que o meio sem adição do elicitor (TABELA 10). Visualmente, foi possível notar uma coloração mais clara no meio suplementado com 5 mM de MeJa em relação às raízes cultivadas nas demais concentrações. O uso da maior concentração de MeJa (20 mM) inibiu o acúmulo de PTOX total (raiz + meio) em 6% em relação ao controle. Anbazhagan et al (2008) reportaram aumento de PTOX com o uso de 20 μM de MeJa em cultura de raízes adventícias de *Podophyllum peltatum*. De acordo com Hazra et al (2017), a estimulação da PTOX em *P. hexandrum* ocorre devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) causada pela adição de MeJa. Além disso, os autores concluíram que as EROs foram responsáveis pela ativação de genes responsáveis pela produção de PTOX.

Tabela 10 - Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; $\mu\text{g/g}$), no meio de cultura (PTOX meio; $\mu\text{g/mL}$), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; μg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; μg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); μg) para a espécie *Hyptis suaveolens* cultivadas no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de metil-jasmonato.

Metil-jasmonato (mM)	PTOX raiz ($\mu\text{g/g}$)	PTOX meio ($\mu\text{g/mL}$)	Total PTOX Raiz (μg)	Total PTOX Meio (μg)	PTOX total (raiz +meio) (μg)
0	24,62 c	0,23 c	0,74 c	12,49 c	13,23 c
5	39,91 a	0,41 b	1,60 a	20,40 b	22,00 b
10	26,86 b	0,48 a	0,77 c	24,09 a	24,86 a
20	27,62 b	0,23 c	1,10 b	11,43 d	12,53 d

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

3.6. Ácido salicílico

As concentrações de ácido salicílico afetaram o crescimento das raízes *in vitro* (TABELA 11 e FIGURA 6). O meio de cultura suplementado com 25 mM do elicitor apresentou maior acúmulo de biomassa nas raízes (MFR_f e MSR_f) e maiores índices de crescimento (ICMF e ICMS) (TABELA 11). O meio suplementado com 100 mM de ácido salicílico inibiu o acúmulo de matéria fresca e seca nas raízes, sendo inferiores ao controle (sem elicitor) (TABELA 11).

Tabela 11 - Matéria fresca (MFR_i) e seca (MSR_i em mg) de raiz inicial, matéria fresca (MFR_f) e seca (MSR_f) de raiz final, índice de crescimento matéria fresca (ICMF) e seca (ICMS) de raízes de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de ácido salicílico.

Ácido salicílico (mM)	MFR_i (mg)	MSR_i (mg)	MFR_f (mg)	MSR_f (mg)	ICMF	ICMS
0	400	14,62	940 c	29,74 b	1,34 c	1,03 b
25	400	14,62	1070 a	33,96 a	1,66 a	1,32 a
50	400	14,62	1040 b	30,30 b	1,59 b	1,07 b
100	400	14,62	860 d	26,92 c	1,14 d	0,84 c

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

Figura 6 - Raízes frescas de *Hyptis suaveolens* cultivadas *in vitro* no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de ácido salicílico (0, 25, 50 e 100 mM).



A produção de PTOX nas raízes (41,65 $\mu\text{g/g}$) foi superior no meio suplementado com 50 mM de ácido salicílico sendo 1,7 vezes maior em relação ao meio sem adição do elicitor (24,66 $\mu\text{g/g}$) e 1,3 vezes maior quanto ao acúmulo de PTOX no meio de cultura (0,31 $\mu\text{g/mL}$) (TABELA 12). O acúmulo de PTOX total (raiz + meio de cultura) foi de 16,65 μg (TABELA 12) sendo 30% a mais em relação meio sem adição do elicitor. Além disso, o meio suplementado com 100 mM de ácido salicílico também induziu maior liberação de PTOX para o meio de cultura (15,32 μg). A adição de ácido salicílico triplicou a expressão de PTOX em cultura de células em suspensão de *Linum album*, pela ativação dos genes PAL, CCR e CAD (cinnamyl alcohol dehydrogenase) (YOUSEFZADI et al., 2010). O aumento da expressão de PTOX também foi observada em células em suspensão de *Juniperus virginiana* com a adição do elicitor (KAŠPAROVÁ et al., 2018). O ácido salicílico é conhecido como um fitohormônio secundário e promotor da expressão de genes para produção de metabólitos secundários ligados a resistência sistêmica contra vários patógenos, como os compostos fenólicos (SINGH; DWIVEDI, 2018).

Tabela 12 - Valores de PTOX encontrados na raiz (PTOX raiz; $\mu\text{g/g}$), no meio de cultura (PTOX meio; $\mu\text{g/mL}$), PTOX total na raiz (Total PTOX raiz; μg), PTOX total em 50 mL de meio de cultura (Total PTOX Meio; μg); PTOX na raiz e no meio de cultura (PTOX total (raiz +meio); μg) para a espécie *Hyptis suaveolens* cultivadas no escuro por 42 dias em diferentes concentrações de ácido salicílico.

Ácido salicílico (mM)	PTOX raiz ($\mu\text{g/g}$)	PTOX meio ($\mu\text{g/mL}$)	Total PTOX Raiz (μg)	Total PTOX Meio (μg)	PTOX total (raiz +meio) (μg)
0	24,66 b	0,24 b	0,74 c	12,06 c	12,80 d
25	25,12 b	0,25 b	0,84 b	12,61 b	13,45 c
50	41,65 a	0,31 a	1,25 a	15,40 a	16,65 a
100	17,74 c	0,31 a	0,53 d	15,32 a	15,85 b

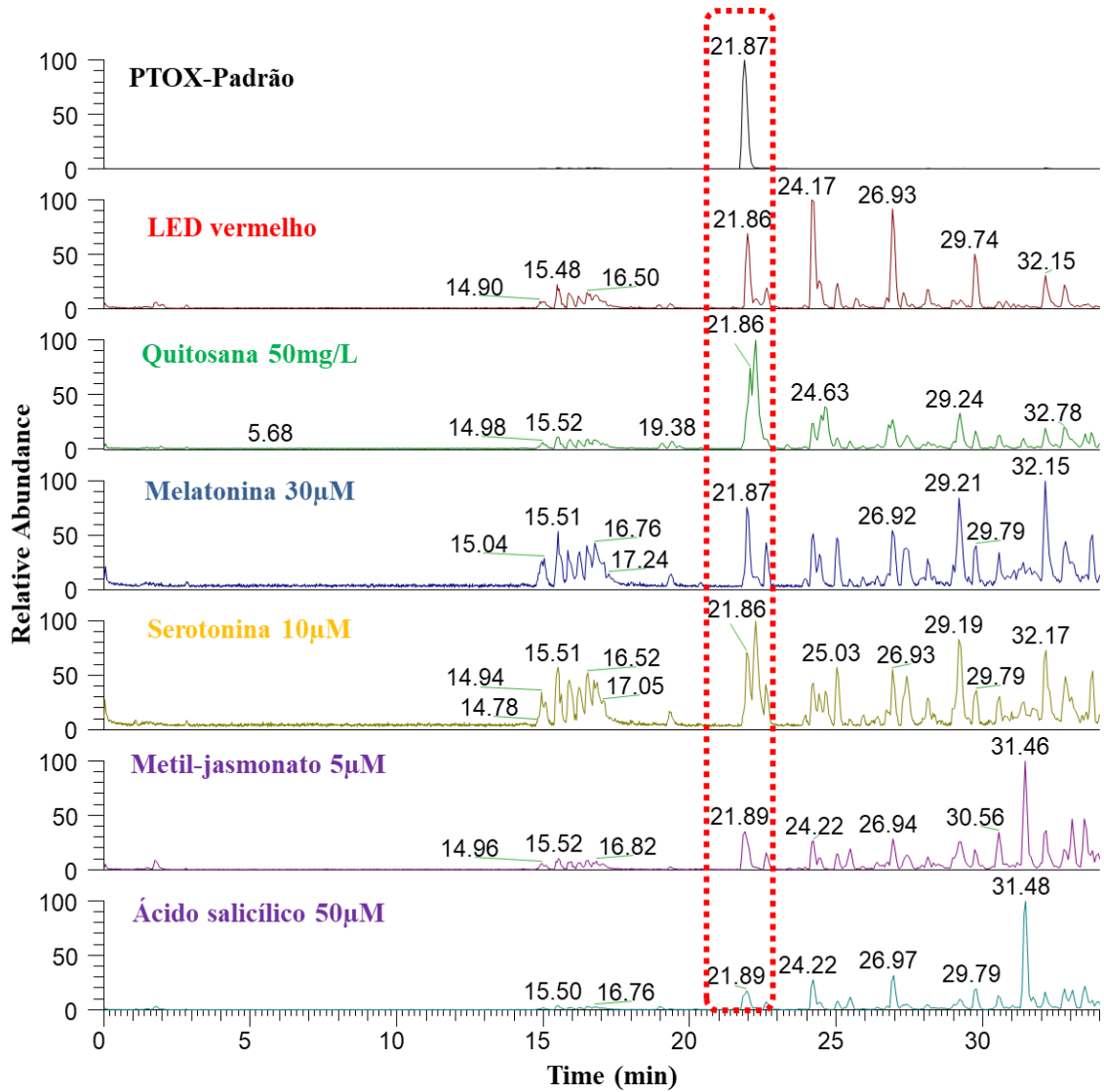
As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.7 Análises de UHPLC-MS/MS

Para confirmação da presença inequívoca da PTOX nos tratamentos mais promissores usando os elicitores acima descritos, foram feitas análises de UHPLC-MS/MS. Essas foram executadas tanto com as amostras das raízes quanto do meio de cultura, através da comparação do tempo de retenção e perfil de fragmentação dessas amostras com o padrão de PTOX (FIGURAS 7 e 8).

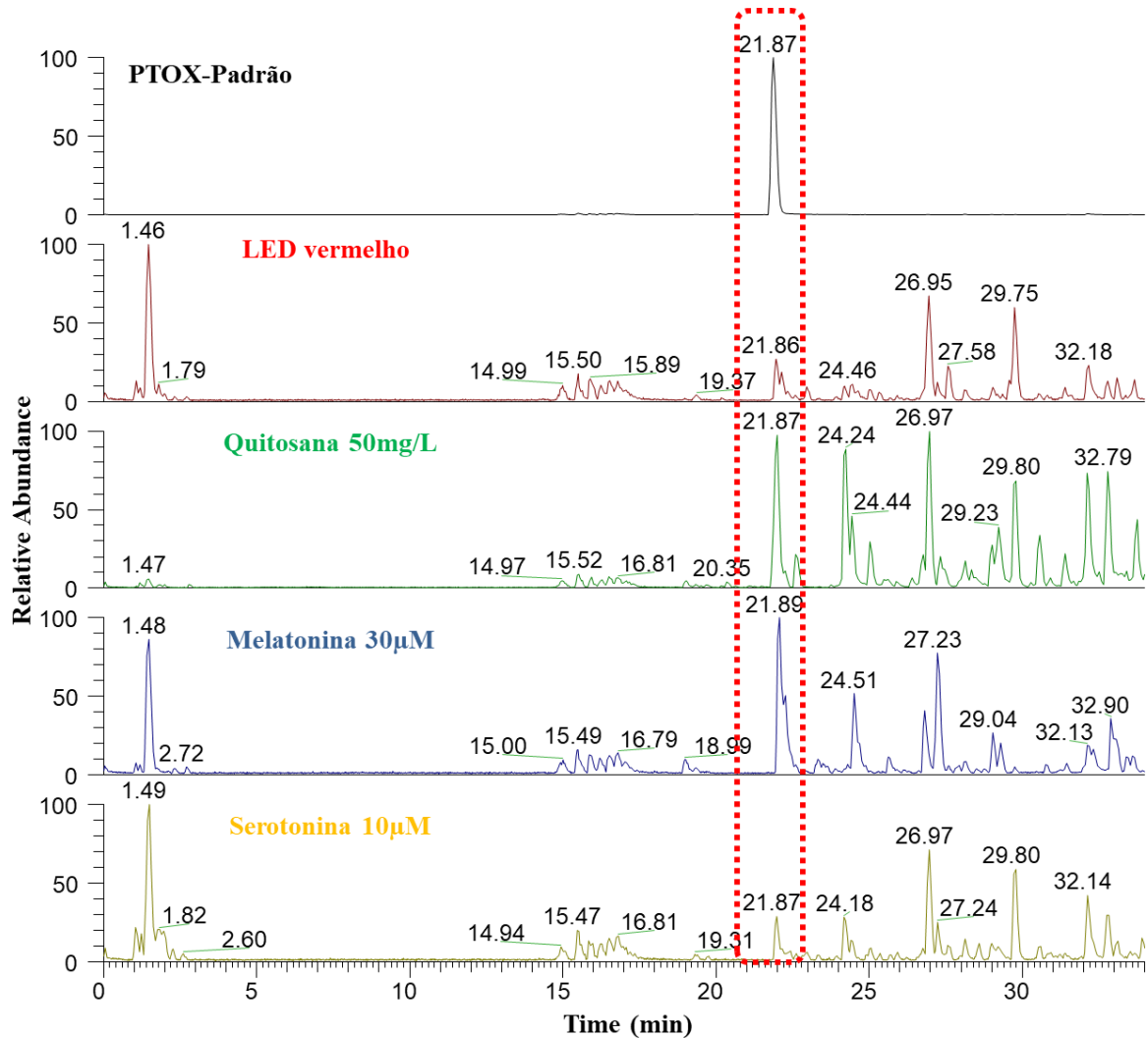
Através da análise do perfil de fragmentação do padrão com o do pico correspondente na amostra no mesmo tempo de retenção foi possível confirmar a presença da PTOX nos tratamentos acima mencionados.

Figura 7 - Cromatogramas de UHPLC-MS/MS (modo positivo) do padrão de PTOX e dos tratamentos mais promissores com os elicitores: LED, Quitosana, Melatonina, Serotonina, Metil-jasmonato e Ácido salicílico nas amostras de raiz.



Fonte: da Autora (2023).

Figura 8 - Cromatogramas de UHPLC-MS/MS (modo positivo) do padrão de PTOX e dos tratamentos mais promissores com os elicitores: LED, Quitosana, Melatonina, e Serotonina nas amostras de meio de cultura.

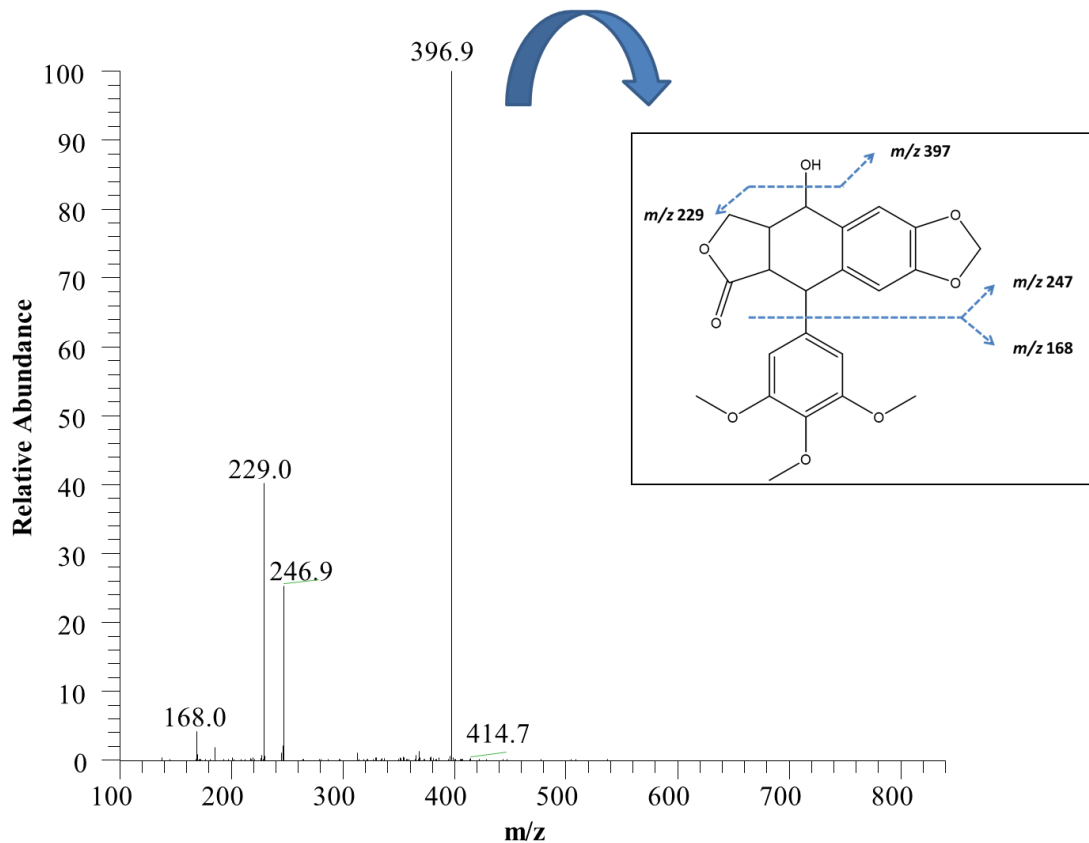


Fonte: da Autora (2023).

A molécula de PTOX ($C_{22}H_{22}O_8$), em modo positivo de análise, gera o íon precursor de m/z 415 Da $[M+H]^+$. No espectro de MS/MS do íon m/z 414.7 $[M+H]^+$ (FIGURA 9), tanto do padrão quanto dos tratamentos mais promissores (tR 21.86, 21.87 e 21.89 min), foi possível observar os fragmentos de m/z 397, 247, 229 e 168 característicos dessa substância (ZHAO et al., 2008). O fragmento mais abundante de m/z 397 refere-se a perda de uma molécula de água $[M+H-H_2O]^+$ pelo íon precursor protonado. A perda da porção 3-trimethoxybenzene (ArH, 168 Da) da molécula de PTOX desidratada, gera o fragmento de m/z 229 $[M-H_2O-ArH+H]^+$. O fragmento da porção ArH de m/z 168 também foi observado no espectro de MS/MS. Por fim o

fragmento de m/z 247 $[M - ArH + H]^+$ refere-se a perda de ArH do íon precursor antes da desidratação.

Figura 9 - Espectro de MS/MS do íon de m/z 414.7 $[M + H]^+$



Fonte: da Autora (2023).

A presença de PTOX no meio de cultura é um resultado promissor pois além de ser uma forma de obtenção da lignana de forma homogênea e contínua, independente de fatores ambientais e sazonais, tem a vantagem de eliminar etapas no processo de purificação. Dessa forma pode-se afirmar que esse metabólito secundário teve sua produção aumentada quando se empregou os tratamentos com 100 mg/L de quitosana, 30 μ M de melatonina, 10 μ M de serotonina e 10 mM de metil-jasmonato.

4. CONCLUSÃO

Os elicitores aumentam a produção de biomassa e PTOX em cultura de raízes de *Hyptis suaveolens*. Além disso, independente do elicitador empregado o maior acúmulo de PTOX é encontrado no meio de cultura.

REFERÊNCIAS

- ADIL, M.; ABBASI, B.H.; KHAN, T. Interactive effects of melatonin and light on growth parameters and biochemical markers in adventitious roots of *Withania somnifera* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, n. 2, p. 405-412, 2015.
- 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 fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v.14, p. 25-30, 2019.
- AGBENIN, N. O. Effect of aqueous extract of some plants on soil micro-fauna and micro-flora in vitro. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 47, p. 205-211, 2014.
- AHMAD, W.; ZAHIR, A.; NADEEM, M.; GARROS, L.; DROUET, S.; RENOARD, S.; DOUSSOT, J.; GUIVARC'H, N. G.; HANO, C.; ABBASI, B. H. Enhanced production of lignans and neolignans in chitosan-treated flax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures. **Process Biochemistry**, n. 1, v. 79, p. 155-165, 2019.
- ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, p. 299-308, 2015.
- ANBAZHAGAN, V. R.; AHN, C. H.; HARADA, E.; KIM, Y. S.; CHOI, Y. E. Podophyllotoxin production via cell and adventitious root cultures of *Podophyllum peltatum*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, n. 6, v. 44, p. 494-501, 2008.
- ANDRADE, H. B. et al. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in vitro plantlets. In: VI **International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants** 1155, p. 277-284, 2017.
- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Growth activity, rooting capacity, and tropism: three auxinic precepts fulfilled by melatonin. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 6, p. 1-9, 2017.
- ASGHARI-ZAKARIA, R.; MALEKI-ZANJANI, B.; SEDGHI, E. Effect of in vitro chitosan application on growth and minituber yield of *Solanum tuberosum* L. **Plant soil environ**, v. 55, n.6, p. 252-256, 2009.
- Chattopadhyay, S.; Mehra, R.S.; Srivastava, A.K.; Bhojwani, S.S.; Bisaria, V.S. Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 541–546, 2003.
- CHAUDHARI, S. K.; BIBI, Y.; ARSHAD, M. *Podophyllum hexandrum*: na endangered medicinal plant from Pakistan. **Pure and Applied Biology**, n. 3, v.1, p. 19-24, 2014.

COELHO, A. D.; DE SOUZA, C. K.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTOS, G. C.; DE OLIVEIRA, T.; MARQUES, E.A.; SALIMENA, J.P.; PINTO, J. E. B. P. Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, n. 1, p. 59-74, 2021.

DA SILVA, S.T. et al. Influence of light quality and some growth regulators in inducing the production of Podophyllotoxin, a bioactive compound against cancer, in adventitious roots formed in the leaves of *Hyptis suaveolens*. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115710, 2022.

DURAN, R.E.; KILIC, S.; COSKUN, Y. Melatonin influence on in vitro callus induction and phenolic compound production in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, p. 468-475, 2019.

ERLAND, L.A.E. et al. Melatonin in plants and plant culture systems: Variability, stability and efficient quantification. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1721, 2016.

ERLAND, L.A.E.; SAXENA, P. K.; MURCH, S. J. Melatonin in plant signalling and behaviour. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 2, p. 58-69, 2017.

ERLAND, L.A.E.; SAXENA, P. K. Melatonin in plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 1, p. 3-24, 2018.

ERLAND, L.A.E.; TURI, C. E.; SAXENA, P. K. Serotonin in plants: origin, functions, and implications. **Serotonin**, p. 23-46, 2019.

FERRI, M.; TASSONI, A. Chitosan as elicitor of health beneficial secondary metabolites in in vitro plant cell cultures. **Handbook of Chitosan Research and Applications**, p. 389-414, 2011.

FÜRDEN, B. V.; HUMBURG, A.; FUSS, E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, n. 24, v. 1, p. 312-317, 2005.

GHIMIRE, B. K.; LEE, J. G.; YOO, J. H.; KIM, J. K.; YU, C. Y. The influence of light-emitting diodes (LEDs) on the growth, antioxidant activities, and metabolites in adventitious root of *Panax ginseng* CA Meyer. **Light emitting diodes for agriculture**, p. 259-272, 2017.

HAZRA, S.; BHATTACHARYYA, D.; CHATTOPADHYAY, S. Methyl Jasmonate Regulates Podophyllotoxin Accumulation in *Podophyllum hexandrum* by Altering the ROS-Responsive Podophyllotoxin Pathway Gene Expression Additionally through the Down Regulation of Few Interfering miRNAs. **Front Plant Science**, n. 1, v. 8, p. 164-172, 2017.

HERNANDEZ-RUIZ, J.; CANO, A.; ARNAO, M. B. Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. **Planta**, v. 220, n. 1, p. 140-144, 2004.

HOSSAN, M. S.; JINDAL, H.; MAISHA, S.; RAJU, C. S.; SEKARAN, S.; NISSAPATORN, V.; KAHARUDIN, F.; YI, L. S.; KHOO, T. J.; RAHMATULLAH, M.; WIART, C. Antibacterial effects of 18 medicinal plants used by the Khyang tribe in Bangladesh. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n.1, p. 201-208, 2018.

- DE HSIE, B. S.; BUENO, A. I. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; DA CUNHA, S. H. B.; MARTINS, E. R.; PINTO, J. E. B. P. Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 198, n. 111577. (2019).
- JAYA, B. P.; DUBEY, N. K. Evaluation of chemically characterised essential oils of *Coleus aromaticus*, *Hyptis suaveolens*, and *Ageratum conyzoides* against storage fungi and aflatoxin contamination of food commodities. **International Journal of Food Science & Technology**, n. 4, v. 46, p. 754-760, 2011.
- KAŠPAROVÁ, M.; PILAŘOVÁ, P.; TŮMOVÁ, L.; SIATKA, T. Effect of Precursor and Phytohormones on Podophyllotoxin Production in *Juniperus virginiana* Suspension Cultures. **Natural Product Communications**, n. 11, v. 13, p. 1527-1529, 2018.
- KATIYAR, D.; HEMANTARANJAN, A.; SINGH, B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 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**, n. 6, v. 37, p. 73-753, 2017.
- LAUTIÉ, E.; VILLARREAL, M. L.; FLINIAUX, M. A. *Hyptis suaveolens*, an alternative source of podophyllotoxin? **Planta Medica**, n. 9, v. 74, p. 1106-1115, 2008.
- LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V.; DOS SANTOS, J.; SILVA, S. T.; DE CARVALHO, A. A.; PINTO, J. E. B. P. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 135, 367-379, 2018.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n. 3, 473-497, 1962.
- MURCH, S. J.; CAMPBELL, S.S.B; SAXENA, P. K. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in in vitro-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 6, p. 786-793, 2001.
- MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Melatonin: a potential regulator of plant growth and development? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 6, p. 531-536, 2002.
- MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Melatonin: a potential regulator of plant growth and development? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 6, p. 531-536, 2004.
- PANDEY, A. K.; SINGH, P.; PALNI, U.T.; TRIPATHI, N. N. In vitro antibacterial activities of the essential oils of aromatic plants against *Erwinia herbicola* (Lohnis) and *Pseudomonas*

putida (Kris Hamilton). **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 3, p. 313-323, 2012.

PELAGIO-FLORES, Ramón et al. Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 3, p. 490-508, 2011.

QIAO, Y.; YIN, L.; WANG, B.; KE, Q.; DENG, X.; WANG, S. Melatonin promotes plant growth by increasing nitrogen uptake and assimilation under nitrogen deficient condition in winter wheat. **Plant, Physiology and Biochemistry**, v.139, p. 342–349, 2019.

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. D. O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, n. 1, p. 69-102, 2017.

SEDIGHEH, E. B.; MOZAFAR, S.; NASER, S.; MEHRDAD, B. Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* culture. **Iranian Journal of Plant Biolog**, n. 11, v. 4, p. 13-25, 2012.

SEDIGHEH, E. B.; MOZAFAR, S.; NASER, S.; MEHRDAD, B. Increased the genes expression of phenylpropanoid biosynthesis pathway and production of podophyllotoxin by chitosan in cell cultures of *Linum album*. **Journal of Biotechnology**, n. 1, v. 4, p. 57-64, 2013.

SHARMA, J.; GAIROLA, S.; SHARMA, Y. P.; GAUR, R. D. Ethnomedicinal plants used to treat skin diseases by Tharu community of district Udham Singh Nagar, Uttarakhand, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.158, n.1, p.140-206, 2014.

SINGH, A.; DWIVEDI, P. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, n. 7, v. 1, p. 750-757, 2018.

SIVANANDHAN, G.; ARUN, M.; MAYAVAN, S.; RAJESH, M.; MARIASHIBU, T. S.; MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. **Industrial crops and products**, v. 37, n. 1, p. 124-129, 2012.

SONIBARE, M. A.; OKORIE, P. N.; AREMU, T. O.; ADEGOKE, A. Ethno-medicines for mosquito transmitted diseases from South-western nigeria. **Journal of Natural Remedies**, v.15, n. 1, p. 33-42, 2015.

SZOPA, A.; EKIERT, H. The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 127(1), 115-121, 2016.

VÉLOZ, R. A.; TAKETA, A. C.; VILLARREAL, M. L. production of podophyllotoxin from roots and plantlets of *Hyptis suaveolens* cultivated in vitro. **Pharmacognos Research**, n. 5, v. 2, p. 93-102, 2013.

YOUSEFZADI, M.; SHARIFI, M.; BEHMANESH, M.; GHASEMPOUR, A.; MOANO, E.; PALOZON, J. The effect of light on gene expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Linum album* cell culture. **Plant Physiology and Biochemistry**, N. 1, V. 56, P. 41-46, 2012.

YOUSEFZADI, M.; SHARIFI, M.; BEHMANESH, M.; GHASEMPOUR, A.; MOYANO, E.; PALAZON, J. Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis. **Biotechnology Letters**, v. 32, n.1, p. 1739-1743, 2010.

ZHAO, L.; TIAN, X.; FAN, P.C.; ZHAN, Y.J.; SHEN, D.W.; JIN, Y. Separation, determination and identification of the diastereoisomers of podophyllotoxin and its esters by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1210, n. 2, p.168-177, 2008.

**ARTIGO 3 – SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE
PODOFILOTOXINA EM RAÍZES DE *Hyptis suaveolens* (L.) POIT**

**ARTICLE 3 – SCREENING OF PODOPHYLOTOXIN-PRODUCING ENDOPHYTIC
FUNGI IN ROOTS OF *Hyptis suaveolens* (L.) POIT**

**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 conhecida por sua atividade antineoplásica. A produção convencional da PTOX ocorre por extração em raízes de espécies do gênero *Podophyllum*, atividade que tem levado espécies à ameaça de extinção. Portanto, existe uma demanda para encontrar novas fontes de exploração sustentável para a produção da PTOX. Atualmente, fungos endofíticos têm sido estudados pela biotecnologia por serem capazes de produzir metabólitos secundários de interesse farmacêutico. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de fungos endofíticos produtores de PTOX em raízes de *Hyptis suaveolens*. Raízes de plantas cultivadas em casa de vegetação foram coletadas e inoculadas em placas de petri contendo meio BDA com antibiótico cefotaxima. Após 7 dias os fungos endofíticos obtidos foram isolados e cultivados em meio líquido BD por 30 dias. Extratos do meio de cultura e do micélio dos fungos foram aplicados em placas de sílica para triagem por cromatografia de camada delgada (CCD), sendo classificados qualitativamente quanto a produção de PTOX. Realizou-se caracterização e quantificação da PTOX por UHPLC-UVMS/MS e HPLC-DAD. Dos 21 fungos endofíticos isolados, 5 foram selecionados na primeira triagem. Entretanto, somente a espécie *Plectosphaerella cucumerina* foi identificada como potencial produtora de PTOX. A espécie não produziu PTOX no micélio, ao passo que foi observado 12,48 µgPTOX/L do meio de cultura. A obtenção de PTOX *via* cultivo do fungo endofítico *P. cucumerina* encontrado nas raízes de *H. suaveolens* é possível e pode ser considerada como uma alternativa sustentável à produção convencional.

Palavras-chave: *Plectosphaerella cucumerina*. Plantas medicinais. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Podophyllotoxin (PTOX) is a lignan known for its antineoplastic activity. The conventional method of PTOX production occurs by extracting the roots of species of the genus *Podophyllum*, an activity that has led species to the threat of extinction. Therefore, there is a demand to find new sources of sustainable exploitation for PTOX production. Currently, endophytic fungi have been studied by biotechnology because they are capable of producing secondary metabolites of economic interest. Thus, the objective of this work was to evaluate the presence of endophytic fungi that produce PTOX in *Hyptis suaveolens*. Roots of plants grown in a greenhouse were collected and inoculated in petri dishes containing PDA medium with cefotaxime antibiotic. After 7 days, the endophytic fungi obtained were isolated and cultivated in BD liquid medium for 30 days. Extracts from the culture medium and fungal mycelium were applied on silica plates for sorting by thin layer chromatography (TLC), being classified qualitatively in terms of PTOX production. Characterization and quantification of PTOX was performed by UHPLC-UVMS/MS and HPLC-DAD. Of the 21 endophytic fungi isolated, 5 were selected in the first screening. However, only the species *Plectosphaerella cucumerina* was identified as a potential producer of PTOX. The species did not produce PTOX in the mycelium, whereas 12.48 µgPTOX/L of the culture medium was observed. Obtaining PTOX via cultivation of the endophytic fungus *P. cucumerina* found in *H. suaveolens* roots is possible and can be considered as a sustainable alternative to the conventional production of this secondary metabolite.

Keywords: *Plectosphaerella cucumerina*. Medicinal plants. Secondary metabolites.

1. INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos, são espécies que habitam a planta hospedeira em uma complexa relação de simbiose na qual os endófitos se favorecem do hospedeiro obtendo proteção e nutrientes, ao passo que a planta hospedeira é beneficiada pela produção de metabólitos secundários que podem melhorar o crescimento vegetal e aumentar a tolerância a estresses bióticos e abióticos (KAUL et al., 2012; BACON; WHITE, 2000).

A descoberta do uso da biotecnologia aplicada ao cultivo de fungos endofíticos permite a produção de metabólitos secundários de interesse químico e farmacêutico, sendo possível a produção em grande escala em biorreatores (KAUL et al., 2012). Os fungos endofíticos são capazes de produzir vários compostos como os alcaloides, terpenoides, flavonoides, cumarinas, quinonas, lignanas, dentre outros (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Podofilotoxina (PTOX) é uma lignana aril-tetralina utilizada como matéria-prima na produção de moléculas derivadas utilizadas como quimioterápicos de alguns tipos de câncer, como NK611, GL-311, TOP-53 e Azatoxina (QIAN LIU; YANG; TIAN, 2007). Entretanto, sua produção tem dependido da extração de raízes de plantas do gênero *Podophyllum* e sua superexploração tem ameaçado espécies de extinção, trazendo a necessidade do desenvolvimento de novos métodos sustentáveis para a produção de PTOX (CHAUDHARI et al., 2014).

Uma das formas de obtenção de metabólitos secundários é via cultura de fungos endofíticos encontrados em plantas hospedeiras que já produzem o composto de interesse (HUANG et al., 2014). Pesquisas reportam a produção de PTOX em fungos endofíticos isolados de algumas espécies vegetais, como *Mucor fragilis* encontrado em *Sinopodophyllum hexandrum* (HUANG et al., 2014), *Fusarium oxysporum* em *Juniperus recurva* (KOUR et al., 2008), *Fusarium solani* em *Podophyllum hexandrum* (MOHAMMAD et al., 2012) e *Phialocephala fortinii* em *Podophyllum peltatum* (EYEBERGER; DONDAPATI; PORTER, 2006).

A espécie *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae) é uma planta medicinal e aromática com atividade bioherbicida, inseticida, repelente, nematicida e bactericida (ADJOU; CHOUGOUROU; SOUMANOU, 2019; SONIBARE et al., 2015; PANDEY et al., 2012; AGBENIN, 2014; JAYA et al., 2011). Além disso, estudos reportaram a presença de PTOX em suas raízes (DA SILVA et al., 2022; VELOZ et al., 2013; TANG et al., 2019). Assim, a *H. suaveolens* tem sido estudada como potencial espécie para produção sustentável de PTOX por

cultura de tecidos vegetais, cultura de raízes e calos (DA SILVA et al., 2022; VELOZ et al., 2013).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo o isolamento de fungos endofíticos em *H. suaveolens*, identificação das espécies e caracterização, assim como o doseamento de PTOX em fungos produtores de PTOX em *H. suaveolens*

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal

Hyptis suaveolens (L.) Poit cultivadas por 90 dias em vasos com substrato comercial em casa-de-vegetação, obtidas por sementes, foram completamente removidas do substrato e lavadas em água corrente. Posteriormente, as raízes foram separadas e encaminhadas ao Laboratório de Bioprospecção de Fungos Filamentosos da Universidade Federal de Lavras.

2.2. Desinfestação do material vegetal

A desinfestação do material foi realizada com imersão em etanol 70% por 2 min, hipoclorito de sódio (2,0% de cloro ativo) por 3 min, seguida de nova imersão em etanol 70% por 1 min dentro da câmara de fluxo laminar horizontal. Em seguida, o material passou por tríplex lavagem em água destilada autoclavada. Raízes foram cortadas em fragmentos de 4 cm inoculadas em placas de *Petri* contendo meio de cultura BDA contendo antibiótico cefotaxima. As placas foram mantidas em câmara de crescimento, com temperatura de 26 °C, ao abrigo da luz.

2.3. Isolamento dos fungos endofíticos

Após a inoculação, os fungos que se desenvolveram foram isolados e transferidos para novas placas de *petri* contendo meio de cultura BDA. Os fungos foram repicados a cada 15 dias até a aquisição de material suficiente para as próximas etapas do experimento.

2.4. Cultivo dos fungos

Os fungos isolados foram cultivados em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido BD (200g/L batata cozida e 20g/L dextrose) e incubados a 26 °C sob agitação em shaker a 100 r.p.m., por 30 dias (FIGURA 1).

Figura 1 - Fungos endofíticos da espécie *Hyptis suaveolens* cultivados em meio líquido BD por 30 dias.



Fonte: da Autora (2023).

2.5. Identificação dos fungos endofíticos

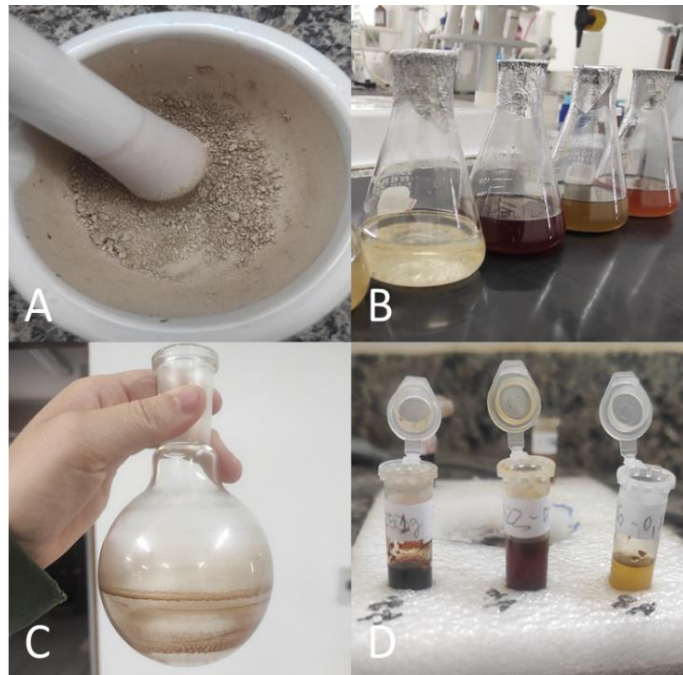
Para a identificação das espécies dos fungos endofíticos produtores de PTOX, foi feita a extração do DNA com kit QuiaGEN, seguido de análise PCR, utilizando os primers ITS (IT4 e ITS5), realizado na Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas/MG). Os resultados obtidos foram comparados com o banco de dados Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para comparação do DNA e identificação das espécies.

2.6. Preparo do extrato para análises cromatográficas

2.6.1. Micélio

O micélio passou pelo processo de liofilização (*freeze drying*) para obtenção da matéria seca (FIGURA 2A). Posteriormente, em Erlenmeyer de 50 mL, 1 g do material foi pesado e adicionado a 10 mL de etanol (98° INPM), que foi mantido sob agitação em *shaker* por 24 h (FIGURA 2B). Em seguida, o extrato foi filtrado sob vácuo e centrifugado (10 min; 10.000 rpm). O sobrenadante foi coletado e concentrado em rotavapor a 37 °C (FIGURA 2C). Em seguida 1 mL de clorofórmio foi adicionado ao balão, passando por sonicação (1 min); o extrato foi coletado com auxílio de uma pipeta e acondicionado em microtubos de 2 mL para completa evaporação do solvente (FIGURA 2D).

Figura 2 - Processo de obtenção do extrato a partir do micélio dos fungos endofíticos encontrados na espécie *Hyptis suaveolens*.



Fonte: da Autora (2023).

Posteriormente, as amostras foram preparadas para análises por cromatografia líquida a partir de 10 mg do extrato de micélio, seguindo a metodologia descrita por Da Silva et al. (2022) para raízes de *H. suaveolens*.

2.6.2. Meio de cultura (sobrenadante)

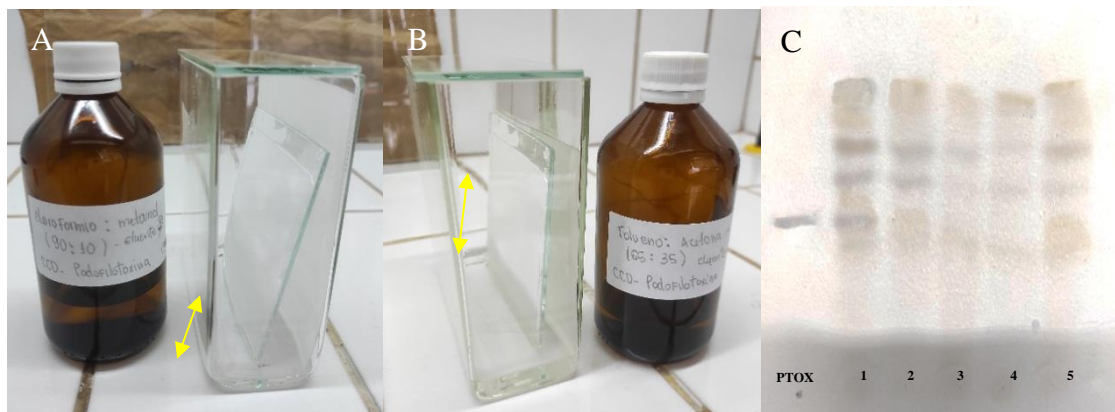
O meio de cultura foi previamente separado do micélio por filtração à vácuo. O preparo das amostras a partir do meio de cultura dos fungos seguiu a proposta de Da Silva et al. (2022) para meio de cultura de raízes, com modificações. O volume de 50 mL de meio de cultura dos fungos filtrado foi duas vezes com 25 mL de clorofórmio. As fases orgânicas foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório. Em seguida, o extrato foi solubilizado em 1000 μ L de Metanol grau HPLC sob sonicação por 2 minutos, seguido de centrifugação (10 min; 10.000 rpm). O sobrenadante foi injetado automaticamente em sistema de cromatografia líquida.

2.7. Seleção dos fungos produtores de PTOX por CCD

Os extratos fungicos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) a fim de caracterizar a presença de PTOX nas amostras e selecionar os fungos produtores. Foram confeccionadas placas de sílica suportadas em vidro, com 0,25 mm de espessura de sílica gel

60G Merck®. Empregou-se solução de PTOX de referência (Sigma-Aldrich; 98% de pureza) a 1 mg/L. As fases móveis e o revelador seguiram o método descrito por WAGNER; BLAT (2009). Aplicou-se 30 µL dos extratos metanólico e 30 µL da solução de referência. A placa foi eluída de forma unidirecional ascendente empregando-se dois sistemas de eluição em duas cubas diferentes: 1) clorofórmio:metanol (9:1, v/v), até 3 cm da placa (FIGURA 3A); 2) tolueno:acetona (65:35, v/v) por 5 cm (FIGURA 3B). A revelação foi realizada por nebulização de solução de etanol (92,8 °INPM) e ácido sulfúrico (1:1, v/v), seguida de aquecimento a 110 °C por 5 min. A análise foi positiva quando se observou banda de mesmo fator de retenção (R_f) que àquela do padrão (FIGURA 3C).

Figura 3 - Análises por CCD para seleção dos fungos endofíticos de *Hyptis suaveolens* produtores de PTOX.



Fonte: da Autora (2023).

2.8. Análises da podofilotoxina no extrato do fungo selecionado

O extrato do fungo selecionado que indicou a presença de PTOX nas análises por CCD (item 2.3.) foi esterilizado utilizando-se membrana de 0,22 µM. A caracterização da presença de PTOX nas amostras e a quantificação foram realizadas conforme descrito nos itens, 2.5.2. e 2.5.3. do artigo 1, respectivamente.

2.9. Análise dos dados

A análise quanto a PTOX nos fungos foi de caráter qualitativo (presença ou ausência de PTOX). Para a produção de PTOX utilizou-se estatística descritiva.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento e identificação dos fungos endofíticos

Foram isolados 21 fungos endofíticos nas raízes da *Hyptis suaveolens*, dentre eles foram identificados: *Epicoccum sorghinum*, *Ceratobasidium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Humicola sp.* e *Plectosphaerella cucumerina* (TABELA 1). Entretanto, os outros fungos não foram identificados devido ao uso somente do primer ITS. Assim, observou-se a necessidade do uso de outros primers para o sequenciamento de todos os fungos endofíticos isolados.

Tabela 1 - Fungos endofíticos isolados nas raízes da espécie *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Primer utilizado: ITS).

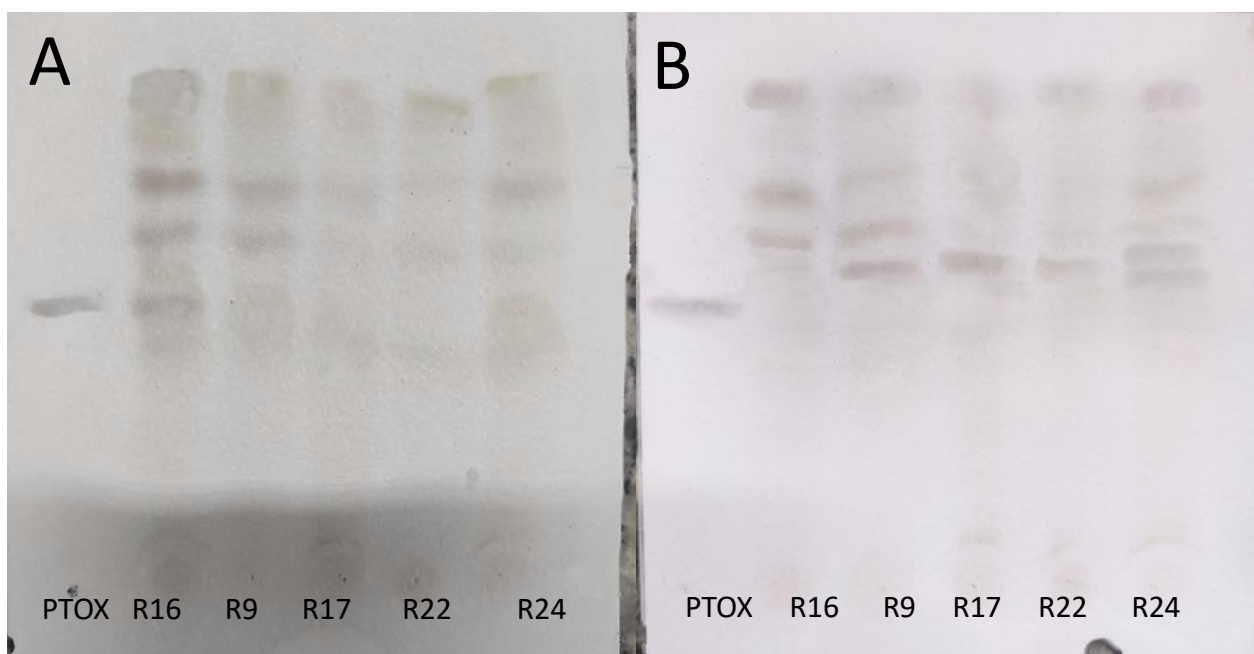
Espécie (Código)	Código genético	ID (%)
<i>Epicoccum sorghinum</i>	GTGATCCGAGGTCAAGAGTGTAAAAATGTACTTTTGGATGTGTCGTCGTTATGAGTGC CAAAGCGCGAGAGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTA AGGCGAGTCTACAGGAGACAAACACCCAACCAAGCAGAGCTTGAAGGTACA AATGACGCTCGAACAGGCATGCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTT CAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGCT GCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAACATT AAGTTTTTTCAGACGCTGATTCAACTGCAAAGGGTTTAAAGTTTGTCCAATCGGT GGGCGAACCCACCGAGGAAACGTAAGGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGATA GCAGGCAAAGCCT	100
<i>Ceratobasidium sp.</i>	GTAGTCCTACGGTGATTTGAGATCAGATCATAAAAAGTATTGTCCAAGTCAATGGA CTATTAGAAGCGGTTTCATCTGCATTTACCTTGGCCACTTTTTACAGTGCCTCAGC GATAGATAACTTATCACGCCGAGTGGAAACCAAGCATAAAGTACTGAGATCCAGCTA ATGAACAAAGAGGAGCAGGTGTGAAGCTGCAAAGACTCCAATACCAAAGTAG AAACCAATTGAGTTAAACAAAAGATTTTAACTTTGAAAGTTTCATGATACTCAAAC AGGCATGCTCCAAGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGA TTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGA TGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAACTTAGTATTAGAT	99,7
<i>Cladosporium sp.</i>	TCAACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCTTTAGCG AATAGTTTTCCACAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGTCGATTTGAGGCA CGCGGGCGGACCGGTTGCCAATACCAAGCGAGGCTTGAGTGGTGAATGACGC TCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATT CGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTT CATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTAAATTTAATTAAG TTTACTCAGACTGCAAAGTTACGCAAGAGTTTGAAGTGTCCACCCGGAGCCCCG CCCGAAGGCAGGGTCGCCCGGAGGCAACAGAGTCCGACAACAAAGGGTTATG AACATCCCGTGGTTA	100
<i>Humicola sp.</i>	AGCGGGTCTTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTGGGTAATAAGGGTTTTAACG GCCGGAACCCGAGCAGCAGCCAGAGCGAGATGTAATACTACTACGCTCGGAGTGAC AGCGAGCCCCGCACTGCATTTACGGGCTTGGCGCAGCCGAGGTCCCCAACACA AGCCGGGGGCTTGATGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATA CTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTC ACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCC GTTGTTGAAAGTTTTGACTTATTAGTACAGAAGACTCAGAGAGGCCATACAATG CAATAGTTTTGGTTTACCTCCGGCGGGCGCCCGGAGGGCCAGGGGC	98,9
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	GGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTGGTGGCCGCGGAGCGGACTTGTGG GGGTTTTAGAGGCAGGACGCCGAGGGATCCCAATGCGAGGCTGATGCTACTGCG CAAAGGAGAGGGCCTTCGGGTCCGCCACTGGTTTTAGGGGCTGCCGTGGCAGA TCCCCAACGCCGGGCCACGGGGGCTCGAGGGTTGAAACGACGCTCGGACAGGCA TGCTCCCAAGGATACTGGAAGGCGCATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACT GAATTCTGCAATTCACATTACATATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCTGG AGCCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTGGACAGTTCGCTAAGAACACTCAGAAGT ATCGTCCGGTTTCGAAAACAGAGATTCTGATGAGACCGGGCGGGCACCTCGCGG CGCCCGCAAGCAACAGGTATAAATAGTTCAAAAAGGGTAGAGAGTGTGATGACTC AGTAATGATCCCTCCGCTGGTTACCAACGGAGACCTTGTTCAGACATATTAC	99,8

Fonte: da Autora (2023). Legenda: ID (%): percentagem de identificação via BLAAST

3.2. Triagem por cromatografia em camada delgada (CCD)

Os fungos foram identificados como R (advindos da *raiz*) seguido do número de identificação, sendo nomeados de R1 a R25. Os extratos dos fungos foram preparados (de acordo com item 2.2.) e aplicados em placas de CCD (FIGURA 4). Destes, somente no meio de cultura do fungo *Plectosphaerella cucumerina*, codificado neste estudo como fungo R16, apresentou a banda com fator de retenção (R_f) semelhante ao da banda de PTOX de referência (FIGURA 4A). Porém, o extrato do micélio não apresentou a banda com mesmo R_f da PTOX (FIGURA 4B).

Figura 4 - Triagem dos extratos dos fungos endofíticos encontrados nas raízes de *Hyptis suaveolens*: A) Meio de cultura; B) Micélio.

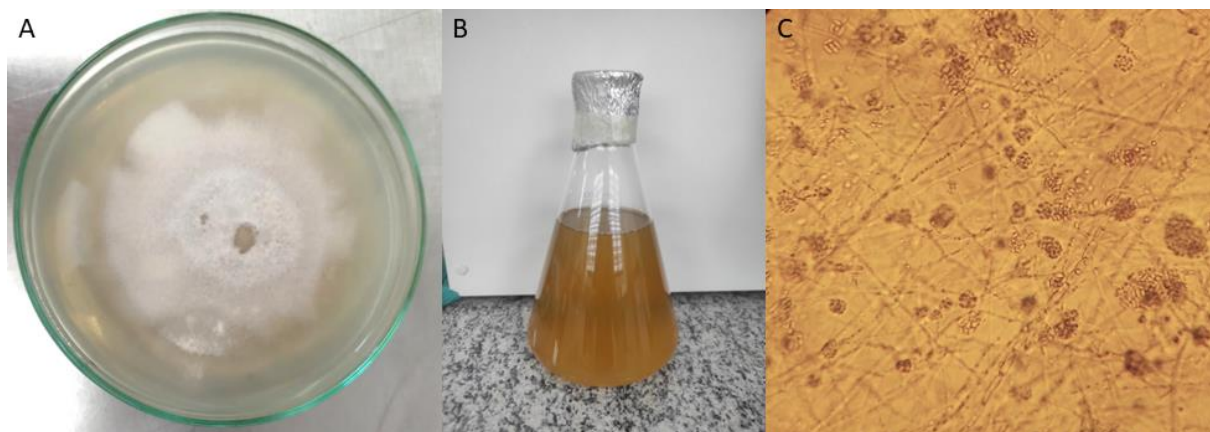


Fonte: da Autora (2023). Legenda: PTOX – podofilotoxina; R16: *Plectosphaerella cucumerina*; R9: *Epicoccum sorghinum*; R17: *Ceratobasidium* sp.; R22: *Cladosporium* sp.; R24: *Humicola* sp.

Plectosphaerella cucumerina (Lindf.) W. Gams é um fungo filamentoso pertencente ao filo Ascomycota conhecido por ser um patógeno agrícola causador da podridão em raízes de hortaliças em todo o mundo (PALM; GAMS; NIRENBERG, 1995). Apresenta como sinônimas: as espécies *Fusarium tabacinum* (J.F.H Beyma) W. Gams e *Plectosphaerella cucumeris* Kleb (GBIF, 2022; PALM; GAMS; NIRENBERG, 1995). Abaixo observamos o fungo *Plectosphaerella cucumerina* em meio de cultura BDA (FIGURA 5-A), após 20 dias de cultivo em BD líquido após 30 dias (FIGURA 5-B) e o fungo com 20 dias de cultivo em meio

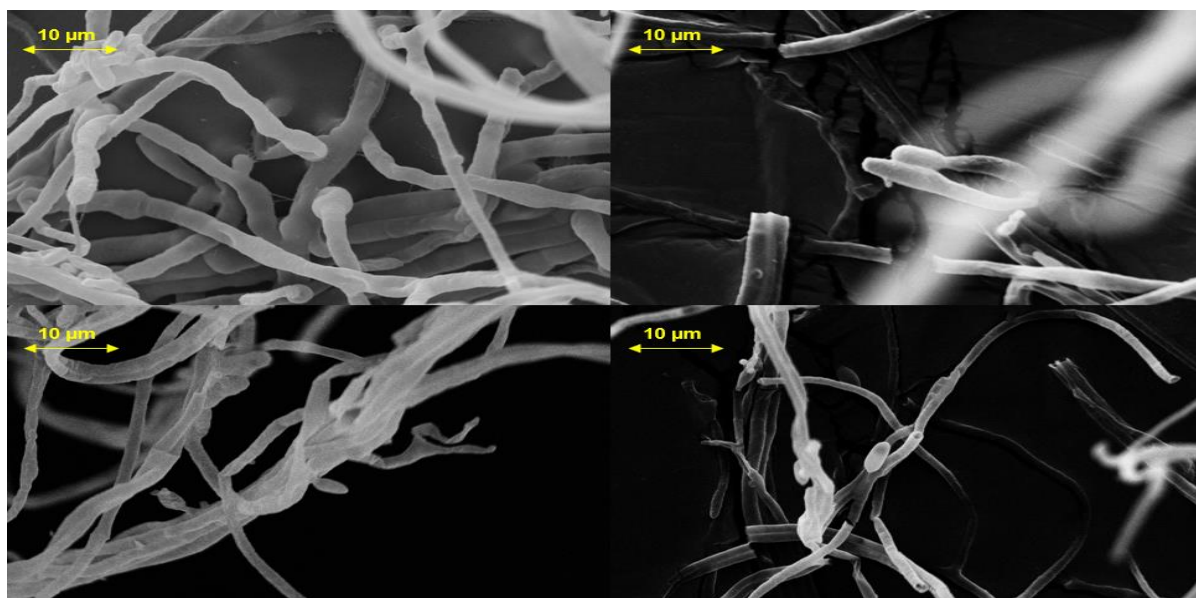
BDA observado em microscopia ótica (FIGURA 5-C) e microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 6).

Figura 5 - Fungo endofítico *Plectosphaerella cucumerina* identificado como produtor de podofilotoxina. A: Fungo cultivado em meio BDA após 20 dias; B: Fungo cultivado em BD líquido após 30 dias; C: Microscopia ótica do *P. cucumerina*.



Fonte: da Autora (2023).

Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do fungo endofítico *Plectosphaerella cucumerina*.

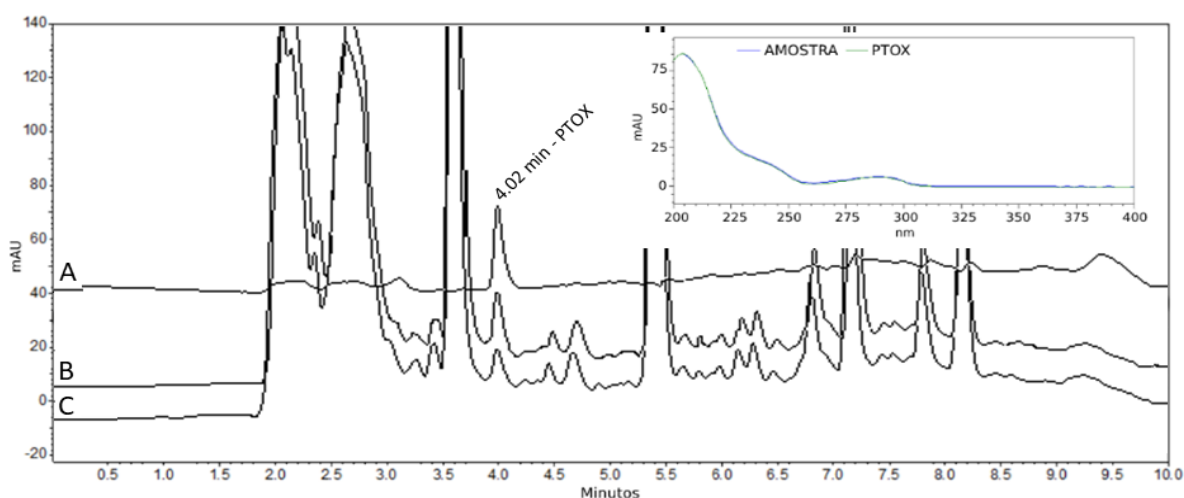


Fonte: da Autora (2023).

3.3. Identificação de podofilotoxina (PTOX) por HPLC-UV e UHPLC-MS/MS

A análise por HPLC-UV confirmou a produção de PTOX pelo fungo endofítico *Plectosphaerella cucumerina* conforme mostrado na Figura 7. O fungo *P. cucumerina* produziu 12,48 µg de PTOX por litro de meio de cultura em 30 dias de fermentação em shaker 100 r.p.m.

Figura 7 - Perfil cromatográfico do meio de cultura de *Plectosphaerella cucumerina* obtido por HPLC-DAD. A: padrão de PTOX; B: Co-injeção da amostra com o padrão PTOX; C: amostra. Os espectros no UV foram obtidos *on-line* pelo detector DAD para a amostra e o padrão PTOX a 210 nm.



Fonte: da Autora (2023).

Análises por UHPLC-MS/MS também foram realizadas para confirmar de forma inequívoca a produção de PTOX pelo fungo *P. cucumerina*. O perfil cromatográfico, obtido para o padrão de PTOX, apresenta um pico com tempo de retenção de 21,87 min (FIGURA 8). O perfil da amostra obtido pelo detector DAD demonstra também um pico com tempo de retenção em 21,81 min (FIGURA 8). O perfil espectral obtido pelo detector DAD para o padrão PTOX e pico correspondente na amostra apresentam máximos de absorção compatíveis entre si. Os máximos de absorção observados são característicos aos máximos de absorção relatados na literatura (205 e 292 nm) (DEKEBO et al., 2002; KAMAL et al., 2013).

A comparação do perfil de fragmentação por MS/MS do padrão de PTOX com a amostra analisada confirmam a produção de PTOX por *P. cucumerina* (FIGURA 9)

Figura 8 - Cromatograma de UHPLC-MS/MS (modo positivo) do padrão de PTOX e da solução estéril de fungos.

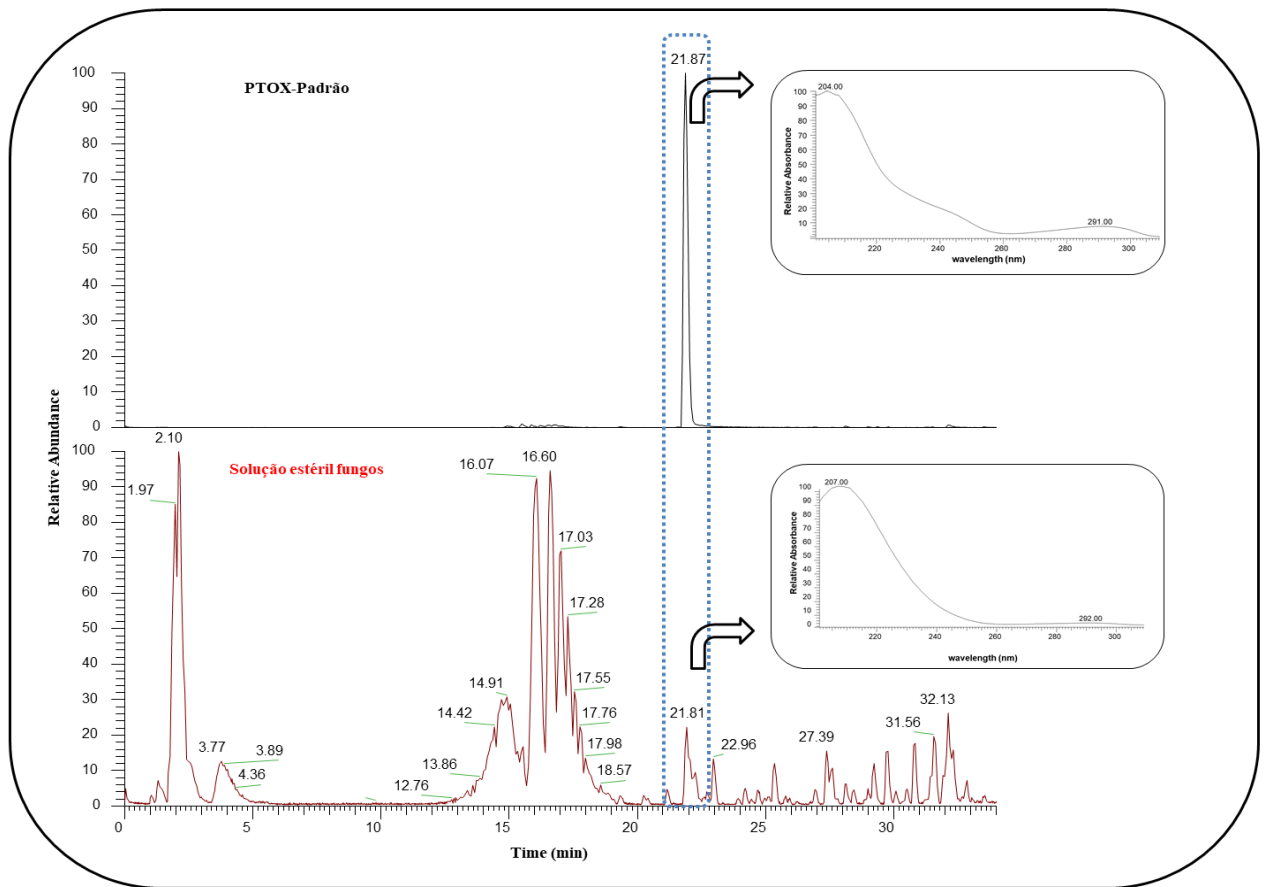
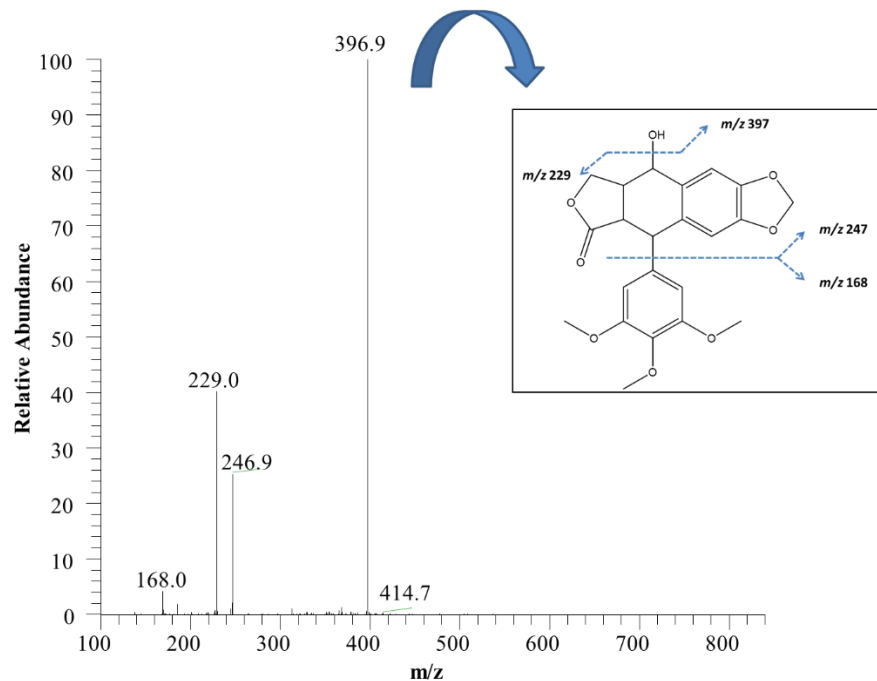


Figura 9 - Espectro de MS/MS do íon de m/z 414.7 $[M+H]^+$.



Fonte: da Autora (2023).

A molécula de PTOX ([C₂₂H₂₂O₈](#)), em modo positivo de análise, gera o íon precursor de m/z 415 Da $[M+H]^+$. No espectro de MS/MS do íon m/z 414.7 $[M+H]^+$, tanto do padrão quanto do tratamento mais promissor (tR 21.87 min), foi possível observar os fragmentos de m/z 397, 247, 229 e 168 característicos dessa substância (ZHAO et al., 2008). O fragmento mais abundante de m/z 397 refere-se a perda de uma molécula de água $[M+H-H_2O]^+$ pelo íon precursor protonado. A perda da porção 3-trimethoxybenzene (ArH, 168 Da) da molécula de PTOX desidratada, gera o fragmento de m/z 229 $[M-H_2O-ArH+H]^+$. O fragmento da porção ArH de m/z 168 também foi observado no espectro de MS/MS. Por fim o fragmento de m/z 247 $[M-ArH+H]^+$ refere-se a perda de ArH do íon precursor antes da desidratação. Dessa forma pode-se afirmar que esse metabólito secundário foi produzido pelo fungo *P. cucumerina*, sendo sua presença confirmada pelos métodos de HPLC-UV e UHPLC-MS.

Esse mesmo fungo foi relatado no trabalho de Zhou e colaboradores (2017) que avaliaram o extrato obtido após 7 dias de cultivo da *P. cucumerina* em meio líquido e reportaram atividade contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato (obtido por acetato de etila) foi de 1,25 mg/mL. Além disso, menores concentrações do extrato (0,25 a 1 mg/mL) inibiram a formação de biofilme da *P. aeruginosa in vitro*. O extrato da *P. cucumerina* reduziu a produção de piocianina em até 70%, toxina necessária para infecção e formação de biofilme da bactéria *P. aeruginosa*. Além disso, os autores indicaram a presença dos compostos fenólicos melleína, citreoisocumarina, patulina e emodina via LC-MS, sendo os dois últimos responsáveis pela inibição e ruptura do biofilme da bactéria patogênica. Dessa forma vários metabólitos secundários da via do chiquimato, assim como a PTOX, tiveram sua biossíntese aumentada via fungos endofíticos, o que demonstra a potencialidade para produção em larga escala.

Uma das formas de produção industrial de metabólitos secundários é via cultura fungos endofíticos, muitas vezes capazes de produzir os mesmos compostos naturais que seu hospedeiro (HUANG et al., 2014). Estudos relatam a presença de PTOX em fungos endofíticos isolados de algumas espécies vegetais. O fungo *Phialocephala fortinii*, obtido dos rizomas da espécie *Podophyllum peltatum*, produziu 189 µg/L de PTOX após 4 semanas em meio de cultura (EYEBERGER; DONDAPATI; PORTER, 2006). *Fusarium solani*, isolado das raízes de *Podophyllum hexandrum* produziu em média 29,0 µg de PTOX por grama de micélio seco (MOHAMMAD et al., 2012). A espécie *Mucor fragilis*, isolada no rizoma da espécie *Sinopodophyllum hexandrum* encontrada nas montanhas Taibai na China, produziu 49,3 µg de PTOX por grama de micélio seco após 7 dias de fermentação em meio de cultura (HUANG et al., 2014). O fungo *Fusarium oxysporum*, isolado em *Juniperus recurva*, produziu 28 µg/L de

PTOX após 4 dias de fermentação (KOUR et al., 2008). Entretanto, não há registros anteriores na literatura relatando a presença de PTOX no fungo *Plectosphaerella cucumerina*. Dessa forma considera-se promissor o emprego da espécie *P. cucumerina* na produção industrial de PTOX em alta escala.

4. CONCLUSÃO

O fungo endofítico *Plectosphaerella cucumerina*, encontrado nas raízes da *Hyptis suaveolens*, exsuda PTOX para o meio de cultura e pode ser considerado uma fonte sustentável para produção industrial de PTOX, produzindo 12,48 µg/L de PTOX após 30 dias de fermentação.

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 fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v.14, p. 25-30, 2019.
- AGBENIN, N. O. Effect of aqueous extract of some plants on soil micro-fauna and micro-flora *in vitro*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 47, 205-211, 2014.
- BACON, C.W.; WHITE, J.F. **Microbial endophytes**. Marcel Dekker, New York, pp 341–388, 2000.
- CHAUDHARI, S. K.; BIBI, Y.; ARSHAD, M. *Podophyllum hexandrum*: na endangered medicinal plant from Pakistan. **Pure and Applied Biology**, n. 3, v.1, p. 19-24, 2014.
- DA SILVA, S. T.; COELHO, A. D.; DE ASSIS, R. M. A.; DE CARVALHO, A. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. Influence of light quality and some growth regulators in inducing the production of Podophyllotoxin, a bioactive compound against cancer, in adventitious roots formed in the leaves of *Hyptis suaveolens*. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115710, 2022.
- DEKEBO, A.; LANG, M.; POLBORN, K.; DAGNE, E.; STEGLICH, W. Four lignans from *Commiphora erlangeriana*. *Journal of natural products*, 65(9), 1252-1257, 2002.
- EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal of natural products**, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, 2006.
- GBIF – Global Biodiversity Information Facility. **Plectosphaerella cucumerina**. <<https://www.gbif.org/pt/species/5254402>> Acesso em: 20 de dezembro de 2022.
- HUANG, J.X.; ZHANG, J.; ZHANG, X.R.; ZHANG, K.; ZHANG, X.; HE, X.R. *Mucor fragilis* as a novel source of the key pharmaceutical agents podophyllotoxin and kaempferol. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 10, p. 1237-1243, 2014.
- KAMAL, A.; SINGH, M.; AHMAD, F.J.; SALEEM, K.; AHMAD, S. A validated HPTLC method for the quantification of podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum* and etoposide in marketed formulation. **Arabian Journal of Chemistry**, 10, pp. S2539-S2546, 2017.
- KOUR, A.; SHAWL, A.S.; REHMAN, S.; SULTAN, P.; QAZI, P.H.; SUDEN, P.; KHAJURIA, R.K.; VERMA, V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1115-1121, 2008.
- NADEEM, M.; RAM, M.; ALAM, P.; AHMAD, M.M.; MOHAMMAD, A.; AL-QURAINY, F.; KHAN, S.; ABDIN, M.Z. *Fusarium solani*, P1, a new endophytic podophyllotoxin producing fungus from roots of *Podophyllum hexandrum*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 10, p. 2493-2499, 2012.

PALM, E.; GAMS, W.; NIRENBERG, H. I. *Plectosporium*, a new genus for *Fusarium tabacinum*, the anamorph of *Plectosphaerella cucumerina*. **Mycologia**, v. 87, n. 3, p. 397-406, 1995.

PANDEY, A. K.; SINGH, P.; PALNI, U.T.; TRIPATHI, N. N. *In vitro* antibacterial activities of the essential oils of aromatic plants against *Erwinia herbicola* (Lohnis) and *Pseudomonas putida* (Kris Hamilton). **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 3, p. 313-323, 2012.

QIAN LIU, Y.; YANG, L.; TIAN, X. Podophyllotoxin: current perspectives. **Current Bioactive Compounds**, v. 3, n.1, p. 37-66, 2007.

SONIBARE, M. A.; OKORIE, P. N.; AREMU, T. O.; ADEGOKE, A. Ethno-medicines for mosquito transmitted diseases from South-western Nigeria. **Journal of Natural Remedies**, v.15, n. 1, p. 33-42, 2015.

TANG, G.; LIU, X.; GONG, X.; LIN, X.; LAI, X.; WANG, D.; JI, S. Studies on the chemical compositions of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **Journal of Serbian Chemical Society**, n. 84, v. 3, p. 245–252, 2019.

VÉLOZ, R. A.; TAKETA, A. C.; VILLARREAL, M. L. production of podophyllotoxin from roots and plantlets of *Hyptis suaveolens* cultivated *in vitro*. **Pharmacognos Research**, n. 5, v. 2, p. 93-102, 2013.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**, v. 23, p. 753–771, 2006.

ZHAO, L.; TIAN, X.; FAN, P.C.; ZHAN, Y.J.; SHEN, D.W.; JIN, Y. Separation, determination and identification of the diastereoisomers of podophyllotoxin and its esters by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1210, n. 2, p.168-177, 2008.

ZHOU, J.; BI, S.; CHEN, H.; CHEN, T.; YANG, R.; LI, M.; JIA, A. Q. Anti-biofilm and antivirulence activities of metabolites from *Plectosphaerella cucumerina* against *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 769, 2017.