

CRESCIMENTO E TEOR DE EMETINA EM PLANTAS DE IPECA (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard.) OBTIDAS *IN VITRO* E SUBMETIDAS ÀS CONDIÇÕES DE SOLUÇÕES NUTRITIVAS EM CASA-DE-VEGETAÇÃO

MARLY PEDROSO DA COSTA¹

JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO²

SUZELEI DE CASTRO FRANÇA³

OSMAR ALVES LAMEIRA⁴

HERACLITO OLIVEIRA CONCEIÇÃO⁵

EDSON JOSÉ ARTIAGA DE SANTIAGO⁶

RESUMO - *Cephaelis ipecacuanha* é uma planta medicinal com o princípio ativo emetina extraído de raízes, o qual é utilizado efetivamente no combate a disenteria, amebiana. O objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento e crescimento de plantas de *Cephaelis ipecacuanha* A.Richard., e correlacionar a adição de solução nutritiva de diversas concentrações com a produção do alcalóide emetina no sistema radicular. As plantas foram multiplicadas *in vitro* e, em seguida, transferidas para a casa-de-vegetação, onde foram submetidas semanalmente às diferentes concentrações dos sais minerais contidos na formulação do meio básico de Murashige e Skoog (MS). Após 6, 9 e 12 meses de

cultivo, foram avaliados os pesos das matérias secas da parte aérea e do sistema radicular e o conteúdo de emetina. Para essas variáveis aos seis meses de cultivo, a solução nutritiva com 25% de concentração dos sais foi a que demonstrou tendência de maior acúmulo de biomassa e biossíntese de emetina. No nono mês, as três variáveis tiveram maiores aumentos com a utilização da solução nutritiva de 50% de concentração dos sais, enquanto que aos doze meses, a solução com 100% de concentração dos sais induziu a maior síntese de emetina (2,325%), e a solução com 50% promoveu a maior produção de biomassa seca na parte aérea (1,52 g) e no sistema radicular (4,94 g).

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Cephaelis ipecacuanha*, emetina, nutrientes, planta medicinal.

GROWTH AND EMETINE CONTENT OF IPECA PLANTS (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard) SUBMITTED ON NUTRITIVE SOLUTION IN GREENHOUSE CONDITIONS

ABSTRACT - *Cephaelis ipecacuanha* is a medicinal plant which has in its roots the active principle emetine, which is effectively utilized in the combat of amebian desintery. The goal of this work was to investigate the development and growth of plantlets from tissue culture relative to different levels of mineral nutrition and its correlation with the production of alkaloid in the root system. The plantlets were multiplied from internodal segments on Murashige and Skoog (MS) basal medium with 6,66 μ M of benzyladenine and shoots obtained were induced to rooting on MS medium with the half the concentrations of the salts, supplemented with 4,92

μ M of indolbutyric acid. Rooted plantlets were transplanted to pots in a greenhouse and subjected to nutritional regimes weekly, utilizing as a nutritive solution, the formulation of macro and micronutrients of the MS medium in the following concentrations: 0, 25, 50 and 100%. The plants were evaluated six, nine and twelve months after transplanted. At six months, the concentration of 25% was the one which yield best induction of biosynthesis of the alkaloid emetine, greatest dry matter yield. At nine months, 50% of the solution of MS salts showed the best results. At twelve months it was verified that 100% of the solution

1. Professora-mestre, Departamento de Biologia, UFPa, Belém,PA, Caixa Postal 8.600, 66.075-970.

2. Professor Titular, Departamento de Agricultura/UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS(UFLA), Lavras,MG. Caixa Postal 37, 37.200-000.

3. Professora-doutora, Laboratório de Biotecnologia, UNAERP, Ribeirão Preto,SP. 14096-380.

4. Engenheiro Agrônomo Doutor, EMBRAPA/CPATU, Belém,PA. Caixa Postal 48, 66.095-100.

5. Engenheiro Agrônomo Doutorando e Mestrando, EMBRAPA/CPATU.

was the best in inducing emetine, however, the plants irrigated with the nutritive solution of 50%, reached

highest yield of emetine in relation to the root system biomass (110,37 mg).

INDEX TERMS: *Cephaelis ipecacuanha*, nutritive solution, emetine, medicinal plant.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais vem aumentando provavelmente pela eficácia que um grande número de preparações farmacêuticas tem demonstrado mediante estudos comparativos com drogas sintéticas (Hamburger e Hostettmann, 1991).

A planta *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard., popularmente conhecida por ipeca, possui em suas raízes o alcalóide emetina, utilizado no combate à disenteria amebiana, além de possuir propriedade adstringente, espectorante e antiinflamatória (Kaplan e Gottlieb, 1990). Em decorrência da sua exploração indiscriminada, destruição das florestas e longo tempo de germinação, a ipeca se encontra em via de extinção. Ocorre na América Central e na América do Sul (Colômbia e Brasil). A maior parte da produção é exportada sob a forma de planta seca, e o Brasil está entre os principais exportadores. A ipeca do Brasil é considerada a mais valiosa, porque possui maiores teores de emetina (Assis, 1993).

Os alcalóides são compostos secundários que contêm em sua estrutura o elemento nitrogênio, cujos precursores são aminoácidos (Goodwin e Mercer, 1983). Segundo Robinson (1974), fatores que estimulam o metabolismo primário, ou o crescimento, como os nutrientes minerais, podem estimular a biossíntese dos alcalóides. O alcalóide emetina é sintetizado a partir da descarboxilação do aminoácido tirosina (Piatti, Boller e Brodelius, 1991).

Foi observado por Montanari Júnior, Figueira e Magalhães (1993), que a adubação com NPK promoveu o aumento na acumulação de biomassa sem alterar o teor do alcalóide. No entanto, plantas de *Datura stramonium*, também utilizadas para fins medicinais, tratadas com $\text{NO}_3\text{-NH}_4$ tiveram o teor do alcalóide hyoscyamina aumentado e também maior acúmulo de biomassa (Demeyer e Dejaegere, 1992). Os resultados encontrados por Kharwara, Awasthi e Singh (1986) demonstraram que plantas de *Papaver somniferum*, quando tratadas com fertilizantes nitrogenados e fosfatos, aumentaram significativamente o teor do alcalóide morfina nas sementes.

A cultura de tecidos vegetais tem sido considerada como uma ferramenta promissora para a preservação de genótipos vegetais, pela propagação comercial de plantas medicinais (Miachir, 1992). De

acordo com Yoshimatsu, Kaio e Shimomura (1994), o mais elevado teor de emetina (1,8%) encontrado em raízes de ipeca foi verificada em plantas propagadas por cultura de tecidos.

O objetivo do presente trabalho, foi correlacionar a produção de emetina com o desenvolvimento e crescimento de plântulas de ipeca provenientes da cultura de tecidos crescendo em substrato comercial suplementado com diferentes soluções nutritivas.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - Minas Gerais.

Obtenção de plântulas in vitro: foram subcultivados segmentos internodais de plântulas assépticas. Os segmentos foram cultivados em meio básico MS (Murashige e Skoog 1962), sólido com 0,7% de ágar, suplementado com 6,66 μM de benzyl aminopurina (BAP). Os brotos originados da terceira subcultura foram transferidos para o mesmo meio com a metade da concentração dos sais, e suplementado com 4,92 μM de ácido indolbutírico (AIB). Após o surgimento das raízes, as plântulas foram transferidas para o mesmo meio com ausência do regulador de crescimento. Logo que as plântulas atingiram o tamanho mínimo de 3 cm de comprimento, foram destinadas à aclimação.

Aclimação: as plântulas foram postas inicialmente em copos plásticos de 250 ml, contendo o substrato comercial Plantimax e aclimatadas em casa-de-vegetação com 80% de umidade, temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e cobertas com sombrite 50%. Depois de duas semanas, foram utilizadas, para dar início aos tratamentos nutricionais.

Tratamentos nutricionais: as plantas foram transferidas dos copos plásticos para sacos de polietileno de 1,0 litro contendo a mistura de terra e areia (1:1). Nos tratamentos nutricionais, utilizou-se como solução nutritiva a formulação dos sais do meio de cultura MS, composto de quatro diferentes concentrações dos sais: T1- controle; T2- 25% da concentração dos sais (1/4 MS); T3- 50% da concentração (1/2 MS) e T4- 100% da concentração dos sais do meio básico de Murashige e Skoog (1/1 MS). O pH das soluções foi mantido em 5,5. As aplicações semanais (20 ml/planta) das soluções tratamentos foram realizadas diretamente no substrato.

Características avaliadas: a matéria seca da parte aérea, do sistema radicular e o conteúdo de emetina fo-

ram avaliados aos seis, nove e doze meses de cultivo. Para a obtenção da matéria seca, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa de circulação forçada (45-50°C) por 48 horas, quando alcançou peso constante. Após a secagem, uma amostra composta foi retirada para análise do alcalóide. A análise de emetina foi realizada por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Submeteram-se 100 mg de raiz seca e triturada à extração com 4 ml de água e 0,025 ml de NH₄OH 2N com pH 9,0, sob agitação por 30 segundos. Posteriormente, 10 ml de éter etílico foram adicionados à emulsão, que foi mantida sob agitação por 2 minutos. Essa mistura foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi extraída por duas vezes e as fases orgânicas resultantes foram reunidas e evaporadas até a secura, resultando no extrato final. Posteriormente, o extrato foi solubilizado em 100 µl da fase móvel, dos quais 20 µl foram injetados no cromatógrafo. As condições de trabalho foram as seguintes: Fase móvel - tampão acetato pH 5,0 / 0,25 N acetonitrila (80:20). Coluna - Lichrospher C-18, (Merck 5 µm / 125

mm x 5 mm). Fluxo de 1,0 ml/min. Comprimento de onda de UV de 282 nm (Metodologia - Comunicação pessoal, Dra. Suzelei de C. França).

Delineamento experimental: inteiramente ao acaso (DIC), em esquema fatorial 4 x 3, constituído de quatro concentrações das soluções nutritivas e três épocas de cultivo. Cada tratamento teve 12 plantas por repetição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de biomassa. Os resultados obtidos por meio das análises de regressão demonstram que a matéria seca da parte aérea e do sistema radicular aumentaram linearmente com as sucessivas épocas de colheita (Figuras 1 e 2). Até aos seis meses de cultivo não houve diferenças significativas entre as soluções nutritivas, indicando apenas uma leve tendência de superioridade da solução com 25% da concentrações dos sais do MS. Isso demonstra que plantas de ipeca não são exigentes nutricionalmente durante esse estágio de desenvolvimento.

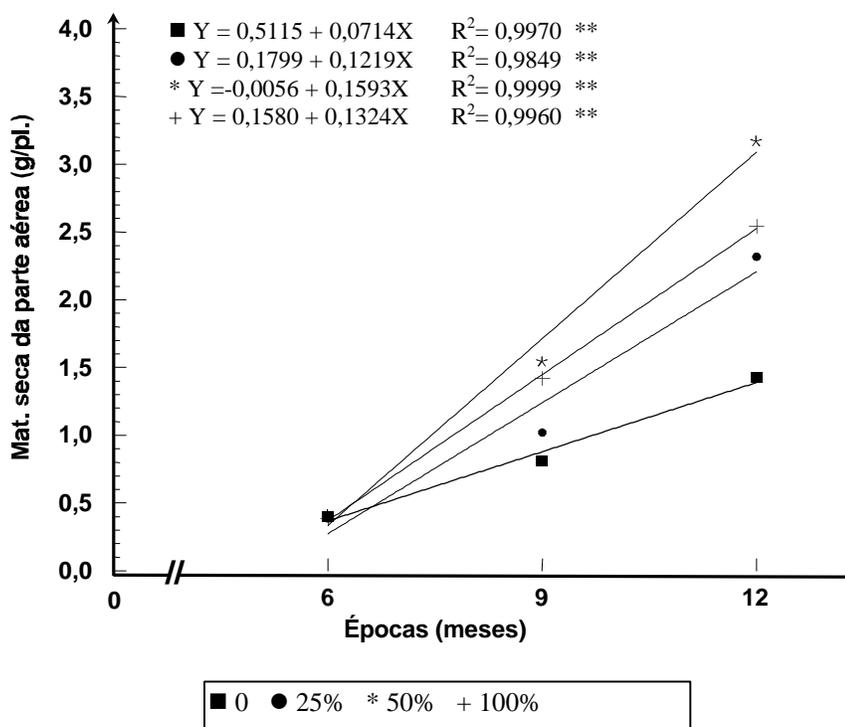


FIGURA 1 - Influência da concentração das soluções nutritivas no acúmulo de biomassa na parte aérea das plantas de ipecacuanha.

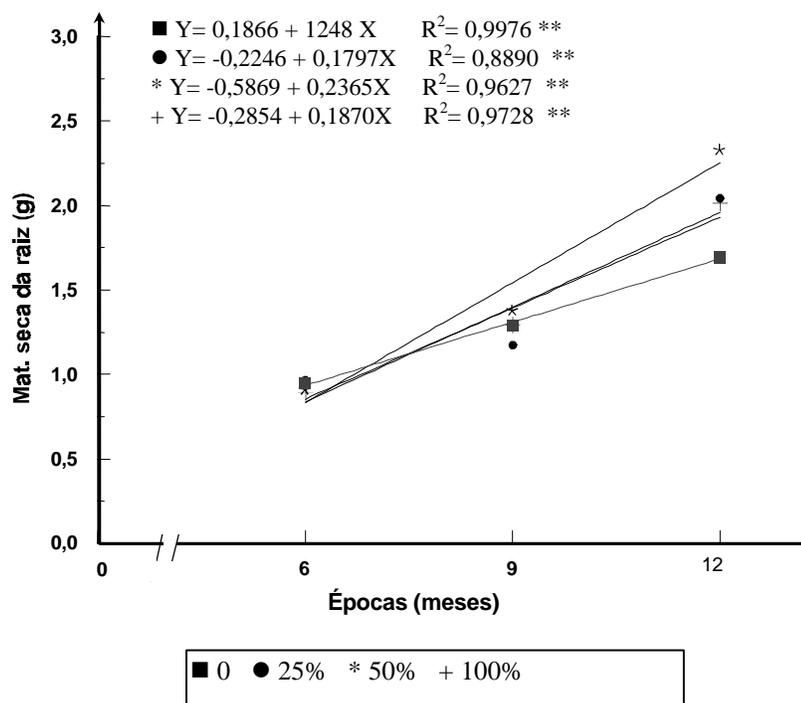


FIGURA 2 -Influência da concentração das soluções nutritivas no acúmulo de biomassa nas raízes das plantas de ipecacuanha.

A partir dos 6 meses, houve aumento da biomassa em ambas as partes da planta, sendo maior naquelas que receberam soluções nutritivas. Mackay e Barber (1986) comentam que a resposta de crescimento das plantas está na dependência do estágio de desenvolvimento.

Aos nove meses de cultivo, observou-se que os maiores acúmulos de biomassa na parte aérea (1,52 g) e no sistema radicular (1,40 g) foram promovidos pela solução nutritiva com 50% da concentração dos sais do meio MS. Proporcionalmente ao controle, os tratamentos com solução nutritiva direcionaram mais biomassa para a parte aérea (Tabela 1). Esse fato é comentado por Aung (1974). A parte aérea e o sistema radicular estão em constante competição pelas substâncias assimiladas ou sintetizadas, sendo que o sistema radicular é considerado um forte dreno, principalmente quando as plantas estão em deficiência nutricional (Salisbury e Ross, 1992).

Aos doze meses de cultivo, o aumento de biomassa continuou sendo mais expressivo com o uso da solução nutritiva de 50% da concentração dos sais do meio MS. A parte aérea acumulou 3,14 g e a raiz 4,94 g de matéria seca. A utilização da solução com

100% da concentração dos sais do meio MS promoveu a segunda maior resposta. Chapin (1980) explica que dosagens nutricionais, acima da exigência de uma determinada espécie, promovem um estado de luxúria nutricional, em que as plantas absorvem os nutrientes, mas não o convertem em biomassa.

Segundo Malzlish, Fritton e Kendall (1980), uma dosagem de um determinado nutriente considerada ótima para uma espécie, pode não ser para outra. Deste modo, Leskovar, Cantliffe e Stoffella (1989) observaram que plantas de *Capsicum annuum* L. requereram inicialmente 84 mg/l de nitrogênio, enquanto que durante a sua fase de floração essa exigência foi aumentada para 112 mg/l de nitrogênio. Do mesmo modo, plantas de *Hyoscyamus muticus* tiveram sua biomassa aumentada em relação ao controle, quando foram tratadas com 90 mg/l de nitrogênio (Yadav, Mohan, Singh e Gupta, 1984).

Conforme observações feitas no sistema radicular, os tratamentos com soluções nutritivas apresentaram raízes mais grossas, quando comparadas com o sistema radicular de plantas sem aplicação de soluções nutritivas.

TABELA 1 - Alocação da biomassa seca (g) na parte aérea e no sistema radicular das plantas de ipeca, submetidas a diferentes concentrações das soluções nutritivas durante três épocas de amostragem.

Conc. da Solução Nutritiva	Épocas (meses)								
	6			9			12		
	Parte Aérea	Sist. Radic.	Aérea/Raiz	Parte Aérea	Sist. Radic.	Aérea/Raiz	Parte Aérea	Sist. Radic.	Aérea/Raiz
0	0,39	0,39	1,00	0,80	1,16	0,68	1,39	2,38	0,58
25 %	0,37	0,42	0,88	1,00	0,87	1,14	2,28	3,67	0,62
50%	0,40	0,33	1,21	1,52	1,40	1,08	3,14	4,94	0,63
100%	0,38	0,29	1,31	1,40	1,16	1,20	2,50	3,55	0,70

Teor do alcalóide emetina: Os teores de emetina aumentaram linearmente durante os doze meses de cultivo com o uso das soluções nutritivas, enquanto que em plantas-controle, a produção cresceu mais até o nono mês, quando houve uma estabilização no teor do alcalóide (Figura3).

No sexto mês, todos os tratamentos com solução nutritiva induziram níveis mais elevados do princípio ativo em relação ao tratamento controle (0,29%). Essa ocorrência confirma o relato de Robinson (1974), em que fatores, como a disponibilidade de nutrientes minerais, que estimulam o metabolismo primário ou o crescimento, podem estimular a biossíntese de produtos secundários.

No nono mês de cultivo, as plantas de ipeca irrigadas com solução nutritiva 50% apresentaram os maiores teores de emetina (1,96%), enquanto que aos doze meses, o maior nível (2,32%) foi promovido com o uso da solução nutritiva de 100%. Esses resultados também estão de acordo com o comentário de Balandrin e Klocke (1988), segundo o qual a síntese dos produtos secundários é feita em função do estágio de crescimento do vegetal.

Kharwara, Awasthi e Singh (1986) alcançaram aumentos de 24% no teor de alcalóide ao tratar plantas de *Papaver somniferum* com fósforo. Um aumento na ordem de 50% foi obtido quando plantas de *Hyoscyamus muticus* foram supridas com 90 mg/l de nitrogênio.

Aumento de 1,06% no teor de emetina foi encontrado em plantas de ipeca provenientes de mergulhia e cultivadas por dois anos em casa-de-vegetação, sem receberem tratamentos nutricionais especiais (Ike-

da et al., 1988). Esses autores comentam que plantas de ipeca provenientes de cultura de tecidos e cultivadas por um ano em casa-de-vegetação, também sem tratamento nutricional, apresentaram 1,29% no teor de emetina. Recentemente Yoshimatsu, Kaio e Shimomura (1994), trabalhando com ipeca, quantificaram 1,8% de emetina em plantas micropropagadas, que foram cultivadas por um ano em casa de vegetação e, posteriormente, transferidas para o campo, permanecendo ali por sete meses.

Nos resultados referentes ao rendimento de emetina em relação à produção de biomassa (Tabela 2), verificou-se que a solução nutritiva induziu maior acúmulo de biomassa seca, 4,94 g (Tabela 1), no sistema radicular aos doze meses de cultivo, assim como promoveu o segundo maior teor de emetina (2,23%), levando no maior rendimento de emetina (110,37 mg) por matéria seca total do sistema radicular (Tabela 2). Já plantas mantidas sem solução nutritiva tiveram, aos doze meses, níveis menores de matéria seca na raiz (2,38 g), e de emetina (1,92%) que, conseqüentemente, promoveram menor rendimento de emetina (45,71 mg).

Resultados semelhantes foram encontrados por Demeyer e Dejaegere (1992). Plantas de *Datura stramonium* tratadas com solução nutritiva contendo nitrogênio alcançaram altos conteúdos do alcalóide hyoscyamina e elevada produção de biomassa e, conseqüentemente, altos rendimentos do princípio ativo. No entanto, Montanari Júnior, Figueiral e Magalhães (1993), quando nutriram plantas de *Atropa belladonna* com NPK, observaram que houve um

aumento de biomassa, mas não alterou o teor do alcalóide.

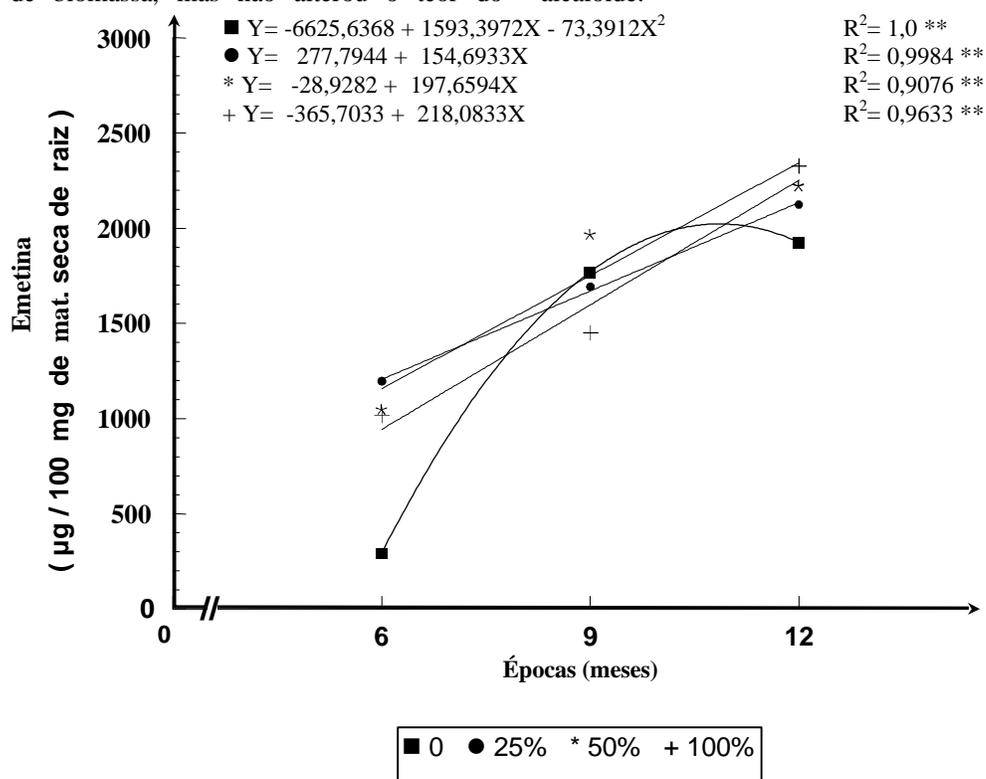


FIGURA 3 - Efeito da concentração da solução nutritiva e época de cultivo no acúmulo do alcalóide emetina em raízes de ipeca.

TABELA 2 - Rendimento de emetina (mg) por produção de biomassa seca das raízes de ipeca, influenciada pelas concentrações das soluções nutritivas e época de amostragem.

Concentração da Solução Nutritiva	Épocas (meses)			% Relativa aos 12 meses
	6	9	12	
0	1,15	20,53	45,71	100,00
25 %	5,13	14,82	77,98	170,59
50%	3,49	27,69	110,37	241,45
100%	2,98	16,86	82,60	180,70

CONCLUSÕES

As soluções nutritivas influenciam no ganho de biomassa da parte aérea e do sistema radicular durante o desenvolvimento e crescimento da plântula.

As soluções nutritivas induzem uma maior síntese de alcalóide no sistema radicular.

A solução nutritiva com 50% da concentração dos sais de MS mostrou melhor desenvolvimento vegetativo e produção do alcalóide.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pelo auxílio financeiro prestado para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London, Academic Press, 1990. 674p.
- ASSIS, M. Desvendando o mistério da ipeca. **Cenargen Informa**, Brasília, v.3, n.11, p. 1-15, fev., 1993.
- AUNG, L.H. Root-shoot relationship. In: CARSON, E.W. **The plant rooting its environment**, 1974. p. 29-61.
- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A. Medicinal, Aromatic, and Industrial materials from plants. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin, Springer Vergas, 1988, v. 4: 540p.
- CHAPIN, F.S. The mineral nutrition of wild plants. **Annual Review Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.11, p.233-260, 1980.
- DEMEYER, K.; DEJAEGERE, R. Effect of the nitrogen form used in the growth medium (NO₃, NH₄) on alkaloid production in *Datura stramonium* L. **Plant and Soil**, The Hague, v.146, p.79-86, 1992.
- GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. **Introduction to plant biochemistry**. Orford, Plorjamon Press, 1983, 671p.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, Elmsford, v.30, n.12, p.3864-3874, 1991.
- IKEDA, K.; TESHIMA, D.; AOYAMA, T.; SATAKE, M.; SHIMOMURA, K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. **Plant Cell Reports**, New York, v.7, p.288-291, 1988.
- KAPLAN, M.A.C.; GOTTLIEB, O.R. Busca Racional de Princípios ativos em plantas. **Interciência**, Caracas, v.15, n.1, p.26-29, 1990.
- KHARWARA, P.C.; AWASTHI, O.P.; SINGH, C.M. Effect of nitrogen, phosphorus and time of nitrogen application on yield and quality of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). **Indian Journal Agronomy**, New Delhi, v.31, n.1, p.26-28, 1986.
- LESKOVAR, D.I.; CANTLIFFE, D.J.; STOFFELLA, P.J. Pepper (*Capsicum annum* L.) root growth and its relation to shoot growth in response to nitrogen. **Journal of Horticultural Science**, Hasford, v.64, n.6, p. 711-716, 1989.
- MACKAY, A.D.; BARBER, S.A. Effect of nitrogen on root growth of two corn genotypes in the field. **Agronomy journal**, Madson, v. 78, n.4, p.699-703, July/Aug. 1986.
- MALZLISH, N.A.; FRITTON, D.D; KENDALL, W.A. Root morphology and early development of maize at varying levels of nitrogen. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, n.1, p.25-31, 1980.
- MIACHIR, J.I. **Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para produção de compostos secundários para *Curcuma zedoaria* Roscoe**. Piracicaba, ESALQ, 1992. 126p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas).
- MONTANARI JÚNIOR, L.; FIGUEIRA, G.M.; MAGALHÃES, P.M. Influência da fertilização NPK na biomassa e no teor de alcalóide de *Atropa belladonna*, Linn. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.71, 1993.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-97, 1962.
- PIATTI, T.; BOLLER, T.; BRODELIUS, P.E. Induction of Ethylen biosynthesis is correlated with but not required for induction of alkaloid accumulation in elicitor-treated *Eschscholtzia* cells.

-
- Phytochemistry**, Elmsford, v.30, n.7, p. 2151-54, 1991.
- ROBBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. **Science**, Massachusetts, v.184, p.430-35, 1974.
- SALISBURY, F.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Carlifornia, Wadsworth, 1992, 682p.
- YADAV, R.I.; MOHAN, R.; SINGH, R.; GUPTA, M.M. Effect of rate and time of nitrogen application on transplanted *Hyoscyamus muticus* Linn. **Indian journal Agronomy**, New Delhi, v.29, n.4, p.553-554, Dec. 1984.
- YOSHIMATSU, K.; KAIO, K.; SHIMOMURA, K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha* (II): Characteristics of regenerated plants field-cultivated in two districts. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v.144, n.1, p.22-25, 1994.