

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

***Valeriana glechomifolia*: crescimento e produção de valepotriatos em diferentes meios nutritivos e avaliação preliminar de atividade neurofarmacológica**

Natasha Maurmann

Porto Alegre
Outubro de 2006

Natasha Maurmann

***Valeriana glechomifolia*: crescimento e produção de valepotriatos em diferentes meios nutritivos e avaliação preliminar de atividade neurofarmacológica**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Beatriz Rech

Porto Alegre
Outubro de 2006

Instituições

Este trabalho foi desenvolvido nos seguintes laboratórios da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS): Laboratório de Fisiologia Vegetal (Departamento de Botânica/Centro de Biotecnologia/UFRGS), Laboratório de Biotecnologia Vegetal/Faculdade de Farmácia/UFRGS, Central Analítica/Faculdade de Farmácia/UFRGS e biotério do Centro de Biotecnologia/UFRGS.

Fontes Financiadoras

O trabalho teve apoio financeiro das agências: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS (PROPESQ) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Banca Examinadora**Dr. Giancarlo Pasquali**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a. Gilsane Lino von Poser

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a. Nadja Schröder

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Outubro de 2006

“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que sou ou como o címbalo que retine. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei. E ainda que eu distribua todos os meus bens entre os pobres e ainda que entregue o meu próprio corpo para ser queimado, se não tiver amor, nada disso me aproveitará”.

1Coríntios 13:1-4

Agradecimentos

Agradeço muitíssimo ao meu orientador, Professor Dr. Arthur G. Fett-Neto, pela grande oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação, proporcionando meu aprimoramento profissional e pessoal. Agradeço ao disponibilização de tempo, ao exemplo de profissional, coerência, dedicação e a experiência que me adicionou com seus ensinamentos e sua sabedoria.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Sandra Beatriz Rech, agradeço a disponibilidade de espaço e de suas orientadas, as bolsistas do Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS e por todo material cedido. Além disso, agradeço pelo apoio, amizade, carinho, atenção e auxílio que sempre recebi durante o mestrado e durante o período de iniciação científica, no qual fui por ela orientada.

Ao Prof. Dr. Rafael Roesler agradeço pela colaboração e orientação nos experimentos de atividades farmacológica, pelos ensinamentos, pela naturalidade que encontra soluções simples, e por aceitar me orientar no doutorado que se inicia. E ao mestrando Gustavo K. Reolon pelo auxílio nos experimentos com camundongos, e pelos ensinamentos, coleguismo, apoio e amizade.

As Bolsistas de Iniciação Científica e ex-bolsistas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Farmácia da UFRGS, minhas colegas, companheiras e amigas que muito me ajudaram durante parte do período das atividades do mestrado: Mariana K. Marchioro, Giovana B. Biancini, Luiza F. Vidal e Evelise Streck. Obrigada pela dedicação. Adoro vocês.

Ao Prof. Dr. Pedro R. Petrovick, pelo empréstimo do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência.

A Prof^a Dr^a Gilsane Lino von Poser pelos ensinamentos e auxílio nas técnicas de isolamento de compostos (flavonóides). E também agradeço as orientadas da Prof. Gilsane e minhas amigas, Carol (Carolina Nör) e Paulinha (Ana Paula Machado Bernardi).

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia/UFRGS, as bibliotecárias, ao Laboratório de Química Farmacêutica: Prof. Dr Pedro Fröhlich (empréstimo do CLAE), Marquinhos, Carol, Samuel, por todo carinho, simpatia, fornecimento de materiais e auxílio nas dificuldades. A Maira, pelas fotos e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia do CBS/UFRGS e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, além do Gustavo, que com tanto carinho me receberam: Ana B., Augusta, Camila, Carol, Dani, Débora, Juliano, Mari, Rodrigo, Silvia, Tati, Thales. Agradeço pelo incentivo, discussões, sugestões no projeto de doutorado e por me tratarem como membro do grupo mesmo antes de eu ser. E agradeço em especial ao Bruno, Jéssica e Nelson, pelo auxílio nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial a Denise, pela oportunidade de colaboração nos experimentos com valeriana e ao Ricardo e Diogo pelo auxílio nos experimentos de atividade de enzimas antioxidantes. E aos colegas da disciplina de Função e Expressão do Genoma Vegetal: Felipe, Raul e Vari.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me permitirem a realização deste trabalho. Aos secretários do PPGBCM, Luciano e Silvia pela ajuda e aos professores pelos ensinamentos. A minha comissão de acompanhamento, Prof^a Dr^a Janette Palma Fett e Prof^a Dr^a Jenifer Saffi.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e oportunidade de mudança do nível de curso pela passagem direta e antecipada de mestrado para o doutorado em 18 meses. E as demais agências de fomento: CNPq, FAPERGS, pelos Bolsistas de Iniciação Científica, que tanto ajudam nas atividades experimentais.

A minha querida família pelo amor, confiança, compreensão, paciência, interesse e apoio. Aos meus pais, Jorge e Aida, pela companhia e ajuda que recebi sempre que precisei. As minhas irmãs, Anna e Karyne, por todas dicas, carinho, companhia, presença. Ao meu namorado, Uilquer pelas sugestões, apoio, paciência, carinho e auxílio nas dificuldades.

As minhas amigas, companheiras e colegas farmacêuticas Ana H. Santos, Cíntia Fochesatto, Luciane Cerioli Menzen e Luciene Vianna.

A Deus, por sua infinita bondade, amor, paz, tolerância, caridade.

São muitos os envolvidos direta ou indiretamente, que me apoiaram nos devidos momentos e acreditaram no meu trabalho. Então agradeço a todos que participaram ou ajudaram a concretizar os objetivos deste trabalho. Sem estas pessoas e estas organizações, a realização desta dissertação não seria possível. Muito obrigada a todos!

Sumário

Resumo.....	9
Abstract.....	10
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	11
I. Introdução.....	12
II. Objetivos.....	31
III. Artigo 1.....	32
IV. Artigo 2.....	40
V. Discussão.....	54
VI. Obras Consultadas.....	60
VII. Perspectivas de Continuidade do Trabalho.....	70
VIII. Natasha Maurmann - <i>Curriculum Vitae</i> Resumido.....	71
IX. Anexos de trabalhos publicados.....	75

Resumo

Valeriana glechomifolia é uma espécie vegetal endêmica da região sul do Brasil. Ela acumula valepotriatos em todos os seus órgãos, que são os possíveis componentes sedativos das espécies de *Valeriana* utilizadas farmaceuticamente.

Foi comparado o crescimento *in vitro* de *V. glechomifolia* em meios de cultura sólidos Murashige e Skoog completo (MS), com 75% dos nutrientes inorgânicos (MS 75) ou em uma formulação modificada (M Δ) em culturas mantidas a longo prazo, por até 9 meses sem subcultura. Alterações da biomassa, do desenvolvimento de raízes e partes aéreas, bem como a produção dos valepotriatos acevaltrato, valtrato e diidrovaltrato foram avaliadas mensalmente. O maior aumento de biomassa e desenvolvimento foliar foi detectado em plantas cultivadas em meio MS, e o melhor desenvolvimento radicular foi observado em plantas cultivadas em meio MS modificado (M Δ) durante o cultivo. A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência mostrou que o máximo de rendimento de valtrato e diidrovaltrato foi após os seis meses de cultivo em plantas em meio M Δ, enquanto a maior concentração de acevaltrato foi encontrada em plântulas cultivadas em meio MS 75, após sete meses de cultivo. Os resultados sugerem uma relação direta entre crescimento e acúmulo de valepotriatos, e um efeito positivo do aumento da quantidade de micronutrientes e de meso-inositol nos rendimentos valepotriatos em plantas mantidas em longo período de cultivo.

Também foi analisado o efeito neurocomportamental de um extrato contendo uma mistura de valepotriatos (EV) de *V. glechomifolia*. Camundongos adultos foram tratados com doses de 1, 3 e 10 mg/kg de EV ou veículo, 30 minutos antes dos testes. Durante a exploração no campo aberto, os camundongos tratados com 10 mg/kg mostraram redução na locomoção e no comportamento exploratório (número de *rearings*) em comparação aos animais controle, e o EV não induziu alteração na ansiedade. Todos os grupos realizaram normalmente a tarefa de memória de reconhecimento de novo objeto, exceto o grupo que recebeu 3 mg/kg, que apresentou piora na memória de reconhecimento do novo objeto. Os resultados indicaram que os camundongos tratados com valepotriatos não apresentaram déficits de memória aversiva de longa duração, e apenas a dose de 3 mg/kg apresentou um prejuízo na tarefa de memória de reconhecimento de novo objeto, além de uma possível propriedade sedativa na dose de 10 mg/kg.

Palavras-chave: Valeriana, cultivo *in vitro*, atividade farmacológica

Abstract

Valeriana glechomifolia is a plant species endemic to southern Brazil. It accumulates the terpene derivatives valepotriates, the presumed sedative components of the pharmaceutically used species of *Valeriana*, in all of its organs.

In vitro growth of *V. glechomifolia* on solid Murashige and Skoog (MS) without phytohormones at full, 75% (MS 75) or on a modified formulation (M Δ) was compared in long term stock cultures kept for up to 9 months without subculture. Changes in biomass accumulation, development of roots and shoots, as well as the production of valepotriates acevaltrate, valtrate and didrovaltrate were monthly evaluated. The best root development was observed in plants grown on modified MS medium (M Δ), whereas highest biomass accumulation and leaf development were detected in MS medium grown plants throughout the period. High Performance Liquid Chromatography analysis showed maximal valtrate and didrovaltrate yields on M Δ grown plants harvested after six months of culture, whereas acevaltrate concentration was highest on MS 75 grown plants after seven months of culture. The overall results suggest a direct relationship between growth and valepotriate accumulation, and a positive effect of increases in micronutrient and myo-inositol amounts on valepotriate yields of long-term stock-cultures.

An extract containing a mixture of valepotriates (EV) of *V. glechomifolia* was evaluated in relation to neurobehavioral parameters. Adult mice were treated with doses of 1, 3 and 10 mg/kg of EV or vehicle, 30 minutes before tests. During exploration of an open field, mice treated with 10 mg/kg showed reduced locomotion and reduced exploratory behavior (number of rearings) compared to control animals, and the EV did not induce alterations in anxiety. All groups performed normally the task of novel object recognition memory, except the group receiving 3 mg/kg dose, which showed decrease in novel object recognition memory. The results indicated that mice treated with valepotriates presented no deficits in long-term memory for aversive training and presented an impairment in novel object recognition memory task only at 3 mg/kg, as well as a possible sedative proprieties at 10 mg/kg.

Key-words: Valerian, *in vitro* cultures, pharmacological activity

Lista de Abreviaturas e Siglas

- 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
5-HT: 5-hidroxitriptamina ou serotonina
ACE: Acevaltrato, Acevaltrate
AIA: Ácido Indol Acético
AIB: Ácido Indol Butírico
ANA: Ácido Naftaleno Acético
BAP: 6-Benzilaminopurina
CNS: Central Nervous System
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DID: Didrovaltrate
DII: Diidrovaltrato
DW: Dry Weight
EV: Extrato com Valepotriatos, Extract with Valepotriates
FW: Fresh Weight
GABA: Ácido Gama-Aminobutírico
GI: Growth Index
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
IAA: Indole Acetic Acid
i.p.: Intra peritoneal
LC: Liquid Chromatography
MS: Meio Murashige & Skoog, Murashige and Skoog Medium
MS 75%: Meio MS com 75% da concentração de sais, 3/4 of MS Sales
M Δ: Meio MS modificado, Modified MS medium
Prep LC: Preparative Liquid Chromatography
PS: Peso Seco
RS: Rio Grande do Sul
SE: Standard Error
SNC: Sistema Nervoso Central
TLC: Thin Layer Chromatography
UV: Ultravioleta
VAL: Valtrato, Valtrate

I. Introdução

Produtos naturais têm servido como importantes fontes de substâncias químicas desde a Antigüidade (Khan, 2006; Raza, 2006). A quimiodiversidade observada na natureza (em plantas, microrganismos e organismos marinhos) revela grandes variações estruturais e de propriedades biológicas, oferecendo assim uma interessante fonte em direção a novas descobertas (Corrado, 2001).

Os vegetais e os produtos derivados do seu metabolismo secundário podem ser utilizados como adesivos e revestimentos, agroquímicos, flavorizantes, fragrâncias, corantes, biopesticidas, além de aditivos alimentícios para fabricação de medicamentos, produtos de interesse terapêutico, que pela cura ou prevenção de doenças apresentam sucesso no decorrer da história (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002; Raskin *et al.*, 2002; Fakim, 2006). Embora as pesquisas de produtos naturais na indústria farmacêutica tenham diminuído na última década, os recentes avanços tecnológicos e as atuais expectativas levaram a um renovado interesse na descoberta de novos compostos com atividades terapêuticas em produtos naturais (Koehn & Carter, 2005). Os medicamentos fitoterápicos e suplementos alimentares tornaram-se uma opção popular em saúde, com um mercado estimado de US\$4 bilhões nos Estados Unidos e US\$6,7 bilhões em Europa (Gruenwald, 2000).

O tratamento de diversas doenças foi obtido a partir de compostos fornecidos pela natureza (Khan, 2006). O advento de medicamentos psicoterapêuticos permitiu o tratamento de doenças mentais e outros problemas neurológicos, como a epilepsia, sem a necessidade de internação hospitalar (Costa *et al.*, 2004). Porém, algumas doenças neurológicas, psicossomáticas e distúrbios psiquiátricos, que têm apresentado crescente aumento, ainda não apresentam claramente elucidadas as suas causas, os seus mecanismos de ação nem os seus tratamentos (Kapczinski & Ribeiro, 2000). Dentre essas doenças, a ansiedade, a depressão e as gastralgias associadas, bem como distúrbios do sono, são tratados com benzodiazepínicos, antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase, enzima responsável pela degradação de aminas bioativas (Graeff & Guimarães, 2001).

A insônia é o distúrbio do sono mais freqüentemente encontrado na população geral: mais de 50 estudos epidemiológicos têm mostrado que 1/3 de diferentes populações apresentaram problemas de insônia (Schenck *et al.*, 2003). A OMS reconhece a insônia como um problema de saúde pública devido ao seu impacto negativo sobre a saúde física e mental, atividade social, capacidade de trabalho e sobre a qualidade de vida do indivíduo (Léger *et al.*,

2002). As conseqüências diurnas da insônia incluem fadiga corporal, energia diminuída, dificuldade de concentração, piora da memória, baixa motivação, perda de produtividade, irritabilidade, dificuldades de relacionamento, aumento de aborrecimento, ansiedade e depressão (Moul *et al.*, 2002; Ohayon & Roth, 2003). Persistentes insones não tratados têm um forte fator de risco para depressão maior (Nowell & Buysse, 2001). Os benzodiazepínicos constituem o grupo de medicamentos mais comumente utilizados de ansiolíticos e sedativo-hipnóticos (Auchewski *et al.*, 2004). São prescritos principalmente como ansiolíticos e hipnóticos, além de possuir ação miorelaxante e anticonvulsivante (Andreatini *et al.*, 2001). Embora apresentem um tratamento relativamente seguro, as restrições à utilização de medicamentos hipnóticos têm sido cada vez maiores, devido à incidência de efeitos colaterais (Andreatini *et al.*, 2001) relacionados à depressão do sistema nervoso central (Hardman *et al.*, 2001). Dentre os efeitos colaterais, os principais são diminuição da atividade psicomotora, prejuízo na memória, desinibição paradoxal, tolerância e dependência, estrutura do sono alterada, crises de abstinência, sonolência e/ou efeito rebote, diminuição da capacidade de trabalho e do estado de alerta em situações de perigo (Kapczinski & Ribeiro, 2000; Poyares *et al.*, 2002) e a potencialização do efeito depressor pela interação com outras drogas depressoras, principalmente o álcool (Longo *et al.*, 2000). Os pacientes que utilizam medicação benzodiazepínica devem ser orientados sobre a ocorrência de prejuízo no rendimento por diminuição da atenção, o que, conseqüentemente, pode aumentar o risco de acidentes com automóveis e outras atividades psicomotoras (Hardman *et al.*, 2001).

Dessa forma, alternativas para distúrbios do sono que não causem tais reações adversas têm sido pesquisadas, como por exemplo, valeriana, passiflora e kava, que são possivelmente os fitoterápicos mais comumente utilizados no mundo (Block *et al.*, 2004). A Organização Mundial da Saúde considera que as preparações farmacêuticas obtidas a partir de *Valeriana officinalis* podem ser utilizadas como alternativa aos benzodiazepínicos, sendo sua principal indicação como sedativo leve (WHO, 1999). É um medicamento presente em diversos Códigos Oficiais Nacionais, como nas Farmacopéias Austríaca, Brasileira, Britânica, Egípcia, Européia, Francesa, Germânica, Grega, Húngara, Iugoslava, Italiana, Japonesa, Holandesa, Norueguesa, Norte-americana, Romena, Suíça, Tchecoslovaca, ex-URSS, no *The US National Formulary*, *FDA's Generally Recognized as Safe*, *German Commission E* (Blumenthal *et al.*, 2000), *Tyler's Honest Herbal*, e *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*. Valeriana parece ter uma larga janela terapêutica, com grande margem de segurança entre a dose ativa e a dose letal (Willey *et al.*, 1995). Testes clínicos relatam alguns efeitos

adversos minoritários (Block *et al.*, 2004), mas a tolerância não é relatada (O'Hara *et al.*, 1998).

A família Valerianaceae contém cerca de 350 espécies no mundo (Bell & Donoghue, 2005), e tem sido subdividida tradicionalmente em três tribos: Triplostegieae, Patrinieae, e Valerianeae, fracionadas em 14 gêneros (Brummitt, 1992; Backlund & Moritz, 1998). Algumas espécies da família Valerianaceae, que são ervas perenes nativas da Europa e Ásia (Tyler, 1994) são fontes de produtos naturais conhecidos desde a Antiguidade (Houghton, 1988). As primeiras descrições para propriedades de cura são relatos de ancestrais Gregos e Romanos (Petkov, 1979), bem como utilizações na medicina tradicional chinesa, por índios americanos e por europeus (Tesch, 2001). Na Idade Média, valeriana foi utilizada como sedativo e agente espasmolítico; no século X, para tratar “aflições nervosas em mulheres” e ansiedade; na Primeira Guerra Mundial, para tratamento de “choques de batalha” (Willey *et al.*, 1995); e na atualidade, partes subterrâneas de algumas espécies de Valerianaceae têm sido utilizadas etnofarmacologicamente nos países europeus, na Ásia e na América do Norte (Sampaio *et al.*, 1993; Cass, 2004). *V. officinalis* é a mais utilizada na medicina e cultivada em larga escala na Europa para preparação de fitomedicamentos (Morazzoni & Bombardelli, 1995; Bos *et al.*, 1996). *V. officinalis* é principalmente utilizada na Europa Ocidental e no Japão; *V. wallichii*, na Índia; *V. edulis*, no México e na China; *V. angustifolia* e *V. Fauriei*, no Japão (Morazzoni & Bombardelli, 1995; Houghton, 1999). *V. officinalis* é vendida sem receita médica em muitos países, totalizando, por exemplo, US\$ 8 milhões nos Estados Unidos, entre julho de 1997 e de 1998 (Stevinson & Ernst, 2000). Em 1998, esteve na lista dos 12 fitoterápicos mais vendidos nos EUA (O'Hara *et al.*, 1998). Também foi a quarta planta medicinal mais vendida na Europa na última década, ao passo que na Austrália está entre as 10 plantas mais vendidas (Wills & Shohet, 2003).

Os principais empregos de fitoterápicos derivados de partes subterrâneas de espécies de Valerianaceae devem-se ao efeito sedativo do sistema nervoso central (SNC), com atividades para tratamento da insônia, depressão, hiperatividade gastrointestinal, com forte efeito antiespasmódico e antiarrítmico, hipotensivo, relaxante, vasodilador e fungicida (Petkov, 1979; Hazelhoff *et al.*, 1982; Fuzzati *et al.*, 1996; Backlund & Moritz, 1998; Houghton, 1999; Dewick, 2000; Cass, 2004; Gilani *et al.*, 2005).

A valeriana é frequentemente utilizada em combinação com outras plantas medicinais sedativas, tais como camomila, melissa, maracujá, erva-de-São-João, framboesa e lúpulo (O'Hara *et al.*, 1998; Berman & Cott, 1999; Cerny & Schmid, 1999; Beaubrun & Gray,

2000; Müller *et al.*, 2003; Müller & Klement, 2006).

Toda a matéria-prima utilizada para produção de fitoterápicos no Brasil à base de valeriana é importada (Houghton, 1988; Hobbs, 1989; Korolkovas, 1999). Em nosso país, estão registrados 11 medicamentos produzidos à base de valeriana: Calmazil® (Abnat), Noctaval® (Sigma Pharma), Sonoripan® (Marjan), Vadorm® (Barrenne Indústria Farmacêutica Ltda.), Valeriane® (Nikkho), Valerimed® (Grupo Cimed), Valmane® (Solvay Farma Ltda.), Valerim® (Fontovit Laboratórios Ltda.), Valerix® (Ativus farmacêutica Ltda.), Valezen® (Laboratório Teuto Brasileiro Ltda.), Traminer® (Ativus Farmacêutica), e 3 fitoterápicos em associação com outras plantas medicinais: Remilev®, em associação com *Humulus* (Achê), Sedantol®, em associação com melissa e maracujá (Dovalle) e Sonhare®, em associação com melissa (Boehringer Ingelheim). Todos são indicados como calmante, para distúrbio do sono, tensão, estresse e como sedativo, sendo compostos por extratos secos de raízes de *V. officinalis*, padronizados em relação aos ácidos valerênicos (ANVISA, 2006; DEF, 2005/06).

No Brasil, foram descritas dezessete espécies de *Valeriana*, encontradas desde Minas Gerais (MG) até o Rio Grande do Sul (RS), com uma distribuição geográfica de gradiente meridional (Sampaio *et al.*, 1993; Sobral, 1999a). Considerando a distribuição mundial, valerianas têm preferência por altas elevações e regiões montanhosas, com muitas espécies nas zonas dos Alpes, e parecem requerer temperaturas mais baixas e umidade elevada para prosperar (Bell & Donoghue, 2005), justificando a maior incidência de espécies no RS. Entre as espécies descritas no Brasil, doze ocorrem no Rio Grande do Sul, sendo essas *V. bornmuelleri*, *V. catharinensis*, *V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. polystachya*, *V. reitzania*, *V. salicarifolia*, *V. scandens*, *V. tajuvensis* e *V. ulei* (Sobral, 1999a, 1999b, 1999c).

V. glechomifolia Meyer (Fig. 1) é uma erva ginodióica, prostrada, enraizada nos entrenós, com tricomas de até 0,2mm de comprimento nas folhas arredondadas, dotadas de 0,6-1,1cm de comprimento e 0,8-1,5cm de largura, mais largas que longas, dentadas, com nervuras secundárias pouco evidentes em ambas as superfícies. Possuem flores pistiladas, frutos oblongos e ramos que se elevam a no máximo 2cm do solo, formando novas raízes a cada brotação (Sobral, 1999a). Esta espécie ocorre em locais abertos nos campos de altitude de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, onde desde 1960 só foi encontrada quatro vezes. *V. glechomifolia* encontra-se na lista de espécies da flora do Rio Grande do Sul ameaçadas de extinção (IBAMA, 1992).



Figura 1. Aspecto geral de *V. glechomifolia*. **Fonte:** Sobral, 1999a.

Atividades Biológicas e Constituintes Químicos de Valerianas

Apesar da ampla utilização e das investigações químicas e farmacológicas referentes à ação sedativa de *Valeriana* spp, ainda não foi relatado o mecanismo de ação preciso para a ação farmacológica dessas plantas (Cass, 2004), e existem controvérsias quanto aos compostos responsáveis pelas atividades biológicas (Tesch, 2001; Cass, 2004). Mas é devido à ação efetiva no tratamento de insônia e distúrbios do sono que valeriana tem sido amplamente utilizada na Europa por décadas (Houghton, 1999), e seu uso tem se tornado popular nos Estados Unidos (Barnes *et al.*, 2002).

Estudos demonstraram que os efeitos sedativos de valeriana foram um pouco inferiores do que os dos benzodiazepínicos e os de outros compostos similares (Leuschner *et al.*, 1993). Um ensaio clínico duplo-cego (em 128 pacientes voluntários) evidenciou que a administração de um extrato aquoso liofilizado de raiz de valeriana, na dose de 400mg/dia provocou diminuição do tempo necessário para adormecer, menor quantidade de movimentos na cama, e sem a clássica ressaca matinal (*hangover*), que ocorre na utilização de outros psicofármacos (Leathwood & Chauffard, 1982). Em outros dois estudos duplos-cegos com 8 pacientes com insônia moderada e 10 pacientes sem insônia, a administração entre 450-900mg do extrato aquoso liofilizado de raiz de valeriana demonstrou diminuição significativa

na latência de início de sono em ambos os grupos (Leathwood & Chauffard, 1985; Balderer & Borbely, 1985).

Os efeitos benéficos de extratos de raízes de valeriana (600mg/dia) foram confirmados em outro estudo duplo-cego, que abrangeu 121 pacientes com insônia, verificando-se 50% de melhora na qualidade do sono em relação ao placebo após quatro semanas de tratamento (Vorbach *et al.*, 1966). Em um ensaio clínico realizado em crianças com déficit intelectual e com insônia, o extrato de valeriana demonstrou melhoras clínicas significativas em relação ao grupo controle (Francis & Dempster, 2002).

Outras espécies de valerianas também se mostraram efetivas, como *V. edulis*, conhecida como valeriana mexicana. Em um estudo clínico cruzado, randomizado, duplo-cego em 20 pacientes com insônia, Herrera-Arellano *et al* (2001) constataram que tanto a administração de 450mg de extrato de *V. edulis* como a de *V. officinalis* aumentaram significativamente a fase REM do sono, melhorando significativamente a qualidade e quantidade do mesmo. Além disso, pode-se comprovar o efeito dos extratos de valeriana em pacientes que haviam deixado ou interrompido seu tratamento com benzodiazepínicos (Poyares *et al.*, 2002).

Até meados do século XX, as ações farmacológicas de extratos de valeriana eram atribuídas aos monoterpenos presentes nos óleos voláteis, como o borneol (Fig. 2a) (Houghton, 1999), bem como aos sesquiterpenos característicos, como os ácidos valerênicos (Fig. 2b) (Dietz *et al.*, 2005). Na década de 1960, após a identificação dos iridóides não glicosilados valepotriatos (Fig. 2c), esses compostos passaram a ser apontados como responsáveis pelo efeito sedativo (Houghton, 1988; Cass, 2004), bem como os seus produtos de degradação, os baldrinais (Fig. 2d) (Houghton, 1999).

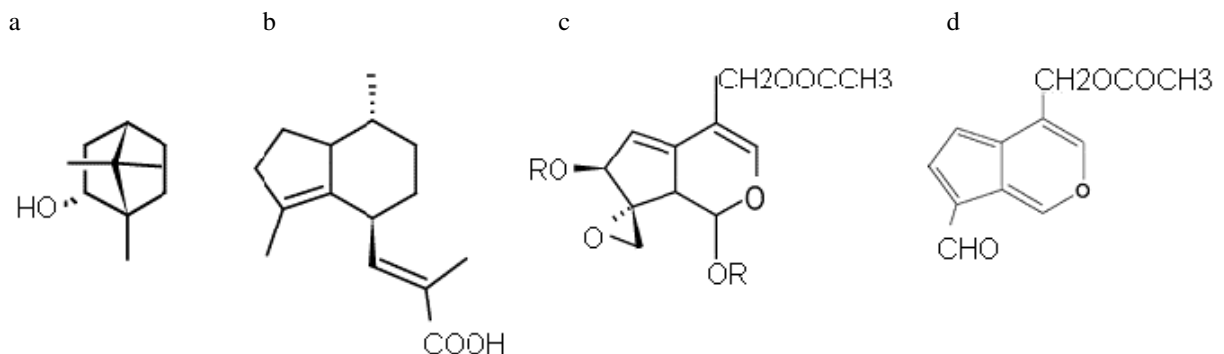


Figura 2. Estrutura molecular dos principais constituintes químicos de valeriana. (a) borneol, monoterpeneo bicíclico presente no óleo volátil; (b) ácido valerênico, sesquiterpeneo presente no óleo volátil; (c) estrutural geral dos monoterpenos valepotriatos; (d) baldrinais. **Fonte:** Houghton, 1999; Fernández *et al.*, 2004; Dietz *et al.*, 2005.

Molecularmente, dados de um estudo de Yuan *et al* (2004) sugerem que os efeitos farmacológicos de extratos de valeriana e ácidos valerênicos são mediados pela modulação da função de receptores de ácido γ -aminobutírico (GABA) do tipo A. É relatado que diferentes constituintes de valeriana interajam com o sistema GABA no cérebro, causando: (a) inibição de GABA-transaminase, (b) interferência na recaptação e liberação de GABA na fenda sináptica (Morazzoni & Bombardelli, 1995; Houghton, 1999) e (c) interação com receptores GABA/benzodiazepínicos, com menor afinidade e efeitos clínicos mais leves (Mennini *et al.*, 1993), explicando, ao menos em parte, o efeito sedativo e ansiolítico de *V. officinalis*. Frações lipofílicas provenientes de extratos hidroalcoólicos totais de *V. officinalis* também demonstraram afinidade por receptores barbitúricos, bem como o diidrovaltrato, com os receptores benzodiazepínicos periféricos (Morazzoni & Bombardelli, 1995). Interação com receptores 5-HT_{1A} e adenosina também foi relatada (Wong *et al.*, 1998). A flavona 6-metilapigenina, isolada de raízes e rizomas de *V. wallichii*, exibiu propriedades agonistas em receptores GABA_A (Wasowski *et al.*, 2002). Extratos de valeriana e ácido valerênico também são agonistas parciais de receptores 5-HT_{5A} (Dietz *et al.*, 2005). A lignana 4'-*O*- β -D-glicosil-9-*O*-(6''-desoxisacarosil)olivila, isolada de raízes de *V. officinalis*, exibiu atividade agonista parcial em receptores de adenosina A₁ (Müller, 2000). Já os valepotriatos demonstraram ligação a receptores dopamínicos, podendo inibir o efeito estimulatório da dopamina endógena no SNC (Houghton, 1999). Também têm sido atribuídas atividades às substâncias polares em extratos de valeriana, como os aminoácidos GABA, glutamato, tirosina, arginina e glutamina (Santos *et al.*, 1994a; ESCOP, 1997; Houghton, 1999), aos alcalóides valeranina e actinidina (Morazzoni & Bombardelli, 1995), aos flavonóides hesperidina (Marder *et al.*, 2003) e linarina (Fernández *et al.*, 2004), às lignanas (Houghton, 1999) ou também a possíveis ações sinérgicas (Hendriks *et al.*, 1981; Morazzoni & Bombardelli, 1995; Houghton, 1999).

Os óleos voláteis possuem composição bastante variável, bem como a concentração (menos de 1% no material pulverizado e não mais que 5% no extrato etanólico) (Houghton, 1999). Na composição do óleo volátil de *V. officinalis* e *V. faueri* foram encontrados monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbonados, oxigenados e ciclopentanóides. Os principais componentes são borneol e seus ésteres acetil e isovalérico (acetato de bornila e isovalerenato de bornila), ácidos valerênicos (ácidos valérico, isovalérico e acetoxivalerênico), valeranona, kesil glicol (Houghton, 1999), α e β -pineno, valerenal, entre outros (Hobbs, 1989; Gränicher *et al.*, 1995; Bos *et al.*, 1996; Tori *et al.*, 1996). Tanto o óleo

da raiz como os compostos voláteis purificados (baldrianol, borneol, isoborneol, acetato de bornila e acetato de isobornila) foram empregados em técnicas de aromaterapia, provocando efeitos sedativos em animais por meio de inalação (Buchbauer *et al.*, 1992). O odor característico considerado desagradável de valeriana ocorre devido a atividades enzimáticas sobre óleos voláteis e outros constituintes, onde o ácido isovalérico é comumente estereificado no anel, e a ligação éster é facilmente hidrolizada (Houghton, 1999).

Como constituintes minoritários, foram isoladas de raízes de *V. officinalis* pequenas quantidades de alcalóides monoterpênicos (Torsell & Wahlberg, 1967), como valerianina (Franck *et al.*, 1970), actinidina e naftiridimetilcetona (Janot *et al.*, 1979), bem como α -metilpirrilcetona e esquiantina (Torsell & Wahlberg, 1967).

Os flavonóides mais relatados para o gênero são quercetina, diosmetina, luteolina, apigenina, acacetina, caempferol, acacetina 7-O- β -soforosídeo, acacetina 7-O-(6''-O- α -ramnopiranosil)- β -soforosídeo, hesperidina, 6-metilapigenina e linarina (Fursa & Litvinenko, 1981; Fursa & Belyaeva, 1983; Fursa *et al.*, 1987; Tang *et al.*, 2002; Wasowski *et al.*, 2002; Marder *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2004). Foram isoladas as lignanas pinoresinol e (+)-1-hidroxi-pinoresinol (Bach *et al.*, 1993).

Os iridóides são compostos classificados em dois grupos: carbocíclicos e seco-iridóides, restritos às dicotiledôneas, sendo abundantes na ordem Dipsacales, na qual está incluída a família Valerianaceae (Dahlgren, 1989). Os iridóides carbocíclicos não glicosilados do tipo valepotriatos são produtos do metabolismo secundário vegetal de valerianas, sendo compostos por um esqueleto monoterpeneo furanopiranoídico (Backlund & Moritz, 1998; Houghton, 1999). Suas variações estruturais devem-se aos diferentes substituintes ácidos esterificados com os grupos hidroxila, à presença ou ausência de um grupo epóxido e ao número e posição das ligações duplas no núcleo principal (Hobbs, 1989). Monoterpenos que apresentam anéis carbocíclicos com configuração 8 β podem ser monoênicos (apenas uma dupla ligação no anel) ou diênicos (uma segunda ligação dupla entre C5-C6 no anel). Os valepotriatos monoênicos mais frequentemente relatados em espécies de *Valeriana* são diidrovaltrato, homodidrovaltrato, isovaleroxi-hidroxi-diidrovaltrato (IVHD-valtrato), acetoxi-hidroxi-valtrato (AHD-valtrato) e isodidrovaltrato, enquanto os diênicos são valtrato, isovaltrato, diavaltrato, homovaltrato, homoacevaltrato, hidroxivaltrato, iso-homoacevaltrato, seneciovaltrato e 1- β -acevaltrato e desacetil-isovaltrato (Thies, 1968; Houghton, 1988; Hobbs, 1989; Bach *et al.*, 1993). Também foram relatados os valepotriatos valtrato-hidrinas,

desoximonoênicos (desoxi-diidrovaltrato e desoxi-homodiidrovaltrato), e patrinósídeo, valeclorina e valerosidato (Bos *et al.*, 2002).

Por não serem glicosilados e possuírem ligações de ésteres, valepotriatos possuem polaridade intermediária, sendo extraídos com solventes alcoólicos, o que explicaria a atividade farmacológica das formas farmacêuticas do tipo tinturas. Valepotriatos são termolábeis e decompõem-se em soluções ácidas, alcalinas e alcoólicas, produzindo ácidos livres e núcleos monoterpênicos, embora os valepotriatos diênicos apresentem-se relativamente estáveis em metanol anidro, estocado a 20°C (Bos *et al.*, 2002). Dessa instabilidade, surgem os produtos de degradação baldrinal, homobaldrinal, desacil-baldrinal, isovaltral e valtroxal (Denee *et al.*, 1979; Houghton, 1988; Hobbs, 1989). Homobaldrinal e o valtroxal parecem ser mais eficientes na diminuição da mobilidade animal em experimentos com cobaias, levando à sugestão de que valepotriatos agem como pró-fármacos (Veith *et al.*, 1986; Houghton, 1999).

Os valepotriatos foram relacionados com propriedades sedativas (Wagner *et al.*, 1980), ansiolíticas (Attele *et al.*, 2002), anti-espasmolíticas (Wagner & Jurcic, 1979), anticonvulsivantes (Hiller & Zetler 1996), fungicidas (Fuzzati *et al.*, 1996), e anti-tumorais (Bounthanh *et al.*, 1981).

Foram isolados e identificados sete compostos de *V. glechomifolia*, sendo quatro valepotriatos diênicos: valtrato (Fig. 3a), diavaltrato (Fig. 3b), acevaltrato (Fig. 3c), 1- β -acecevaltrato (Fig. 3d), dois valepotriatos monoênicos: diidrovaltrato (Fig. 3e), AHD-valtrato (Fig. 3f) e o iridóide glicosilado dihidrocornina (Fig. 3g) (Salles *et al.*, 2000).

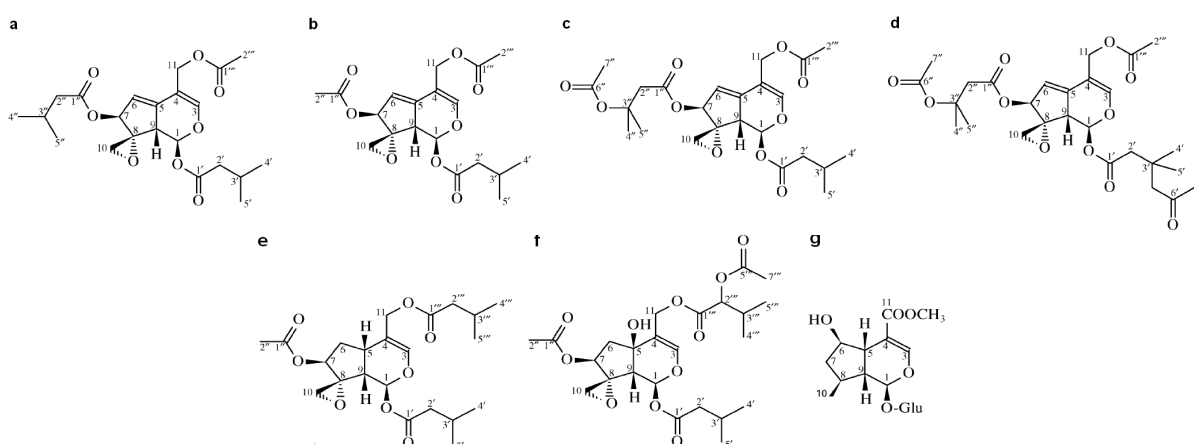


Figura 3. Estrutura química dos iridóides encontrados em *V. glechomifolia*: (a) valtrato, (b) diavaltrato, (c) acevaltrato, (d) 1- β -acecevaltrato, (e) diidrovaltrato, (f) AHD-valtrato e (g) dihidrocornina. **Fonte:** Salles *et al.*, 2000.

Não existem até o momento relatos de síntese orgânica de valepotriatos. A síntese química total de moléculas só é viável economicamente quando o composto de interesse possui uma estrutura simples, o que não é o caso da maioria dos produtos naturais (Verpoorte, 2000).

Backlund & Moritz (1998) propõe que os iridóides sejam biossintetizados a partir de duas rotas principais, em que dois grandes grupos de iridóides (carbocíclicos e *seco*-iridóides) são formados a partir de precursores – iridodial e *epi*-iridodial (Fig. 4). Na rota iridodial, o ácido mevalônico é o precursor, e o pirofosfato de geranila, o intermediário. Na rota de biossíntese da série 8-*epi*, ou seja, iridóides com estereoquímica 8 β (C-10 em conformação β), *epi*-iridodial, via *epi*-iridotrial, com posterior oxidação de C-11, a aglicona se origina do ácido *epi*-desoxilogânico. Esse ácido, por glicosilação, fornece ácido *epi*-desoxilogânico, o precursor dos iridóides carbocíclicos com estereoquímica 8 β .

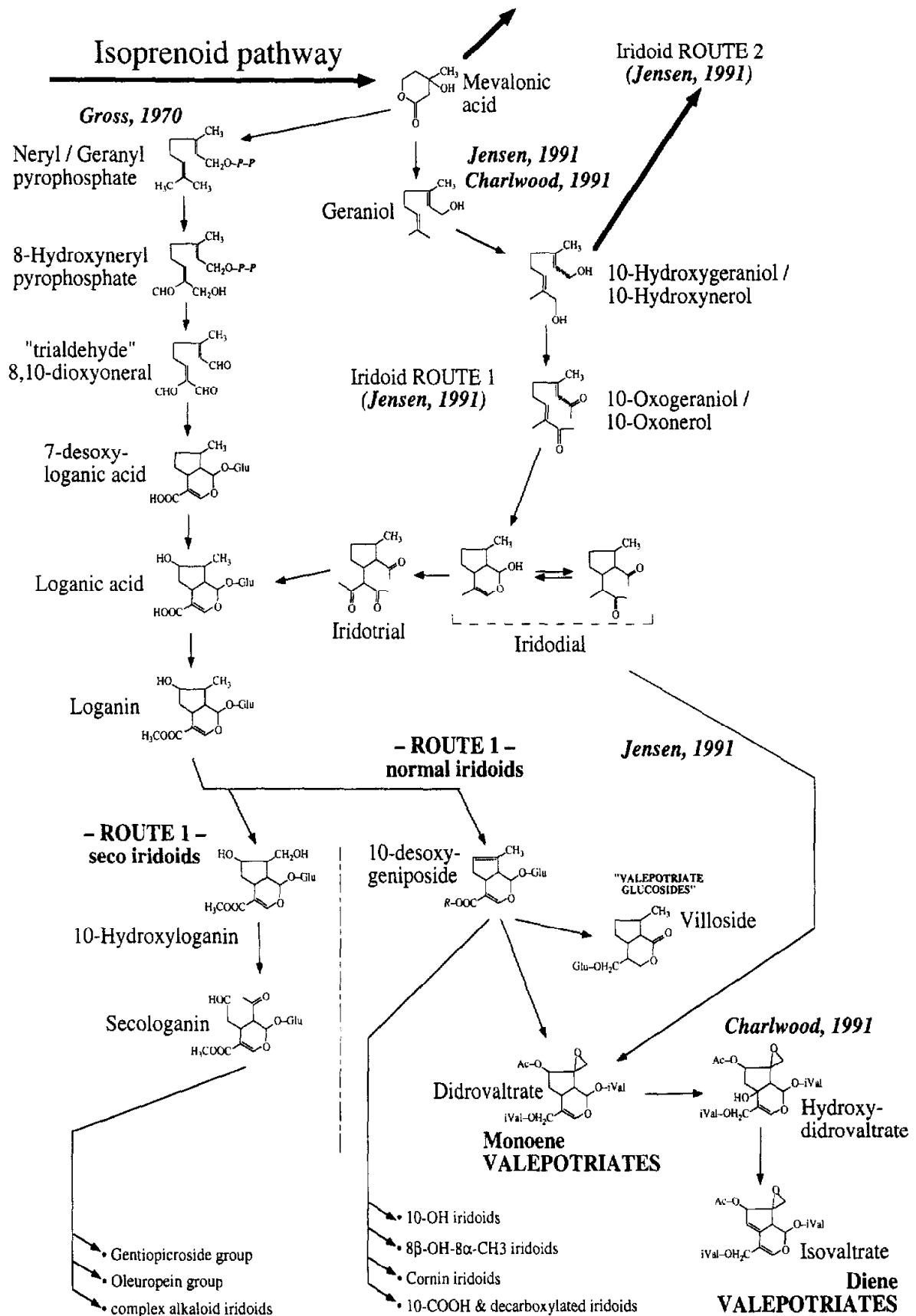


Figura 4. Esquema hipotético da rota biossintética sugerido de iridóides, com ênfase nos valepotriatos. **Fonte:** Backlund & Moritz, 1998.

As concentrações de valepotriatos variam muito entre as espécies: 1,5-2% em *V. officinalis*, 3% em *V. wallichii*, 7% em *V. mexicana* (Hobbs, 1989) e 8% em *V. edulis* (Houghton, 1999), sendo que na maioria das espécies de valerianas, os valepotriatos concentram-se nas raízes e rizomas (Hobbs, 1989; Bos *et al.*, 1998), embora tenha sido relatada a presença de 3,8% nas flores e 5,9% nas folhas de *V. kilimandascharica* (Dossaji & Becker, 1981). Também há relatos de valepotriatos nas partes aéreas de *V. wallichii* (sin. *V. jatamansii*), *V. sitchensis* ssp. *scouleri*, *V. microphylla*, *V. dioica*, *V. tripteris* e *V. simplicifolia* (Funke & Friedrich, 1975; Hölzl & Jurcic, 1975; Dossaji & Becker, 1981; Foerster *et al.*, 1984; Bach *et al.*, 1993). As maiores quantidades relatadas de valepotriatos totais foram de 14,5%, nas raízes de *V. thalictroides*; entretanto, apesar da alta produção, as raízes desse vegetal não podem ser utilizadas eficientemente para suprir a demanda para uso terapêutico, uma vez que possuem pequeno porte (Becker *et al.*, 1983).

Na espécie em estudo, *V. glechomifolia* Meyer, foram identificadas aproximadamente as mesmas quantidades de valepotriatos nas partes aéreas e subterrâneas (Salles *et al.*, 2000), o que permite extração de compostos com a manutenção dos indivíduos, não sendo necessária a extração da raiz e a conseqüente morte da planta para obtenção dos valepotriatos (Salles *et al.*, 2002). Entre as espécies nativas do Rio Grande do Sul estudadas, *V. glechomifolia* apresentou os maiores teores de valepotriatos totais quantificados (superior a 2%), sendo valtrato e acevaltrato os majoritários (Salles *et al.*, 2000; Silva, 2001; Silva *et al.*, 2002). Além disso, foi identificado o valepotriato 1- β -aceacevaltrato, descrito apenas em *Phyllactis pulvinata* (Salles *et al.*, 2000). Os maiores teores de valepotriatos, bem como a presença desses compostos nas partes aéreas, tornou interessante o estabelecimento do cultivo *in vitro* de células e tecidos (Salles, 1999; Silva, 2001; Carvalho, 2003). O protocolo desenvolvido para a micropropagação de plântulas de *V. glechomifolia* possibilitou a propagação da espécie e gerou plântulas com morfologia normal (Salles *et al.*, 2002). A quantificação de extratos das plântulas micropropagadas demonstrou que os seus teores de valepotriatos eram superiores aos da planta *in natura*, mantendo a maior concentração das substâncias nas partes aéreas (Silva, 2001). Para finalizar o processo de propagação, Carvalho *et al* (2004) investigaram a otimização do enraizamento, a adaptação das plantas em casa de vegetação e aclimatação.

Biotecnologia Vegetal

Com o crescimento da população mundial e a limitada quantidade de terra arável para produção de alimentos, o uso do solo para a produção de medicamentos a partir de plantas torna-se restrito, e é importante a busca de alternativas como melhoramento das plantas para maiores produções em menores extensões de terra (Rout *et al.*, 2000; Pretty *et al.*, 2003). As reservas vegetais nativas são esgotáveis e constituem a única opção viável para obtenção de certas substâncias. O extrativismo puro e simples tem conseqüências irreversíveis em relação à conservação das espécies (Verpoorte, 2000). Nesse contexto, a biotecnologia representa alternativas para a obtenção de compostos de origem vegetal (Dicosmo & Misawa, 1995; Gontier *et al.*, 2002).

Pode ser considerado que a biotecnologia abrange, pelo menos, quatro áreas de trabalho: (i) cultura de tecidos e micropropagação, (ii) caracterização de marcadores moleculares da diversidade genética, (iii) mapas genéticos, seleção assistida por marcadores e genômica, e as disciplinas relacionadas a proteômica e metabólica e (iv) modificação genética e a produção de organismos transgênicos (FAO, 2004).

A biotecnologia vegetal oferece a oportunidade de melhora genética das espécies, proporcionando plantas com propriedades e características fenotípicas desejáveis, como resistência a herbicidas, insetos e patógenos e/ou maior produtividade das substâncias desejadas, sendo que os metabólitos secundários podem ser extraídos de plantas inteiras ou produzidos por células vegetais, tecidos ou órgãos cultivados em condições assépticas (Rout *et al.*, 2000).

A micropropagação oferece como vantagens para a prática agrícola a maior rapidez na obtenção de um grande número de mudas e a erradicação das pragas e doenças da cultura, principais responsáveis pela baixa produtividade da planta. A clonagem *in vitro* é particularmente útil para a conservação de espécies ameaçadas de extinção e para a propagação de espécies recalcitrantes ou de ciclo de vida longo, podendo ser aplicada às espécies vegetais produtoras de princípios ativos úteis e serem exploradas economicamente (Rachamandra Rao & Ravishankar, 2002). Na indústria farmacêutica, a propagação vegetativa *in vitro* é a aplicação mais prática da cultura de tecidos, sendo utilizada em muitas espécies vegetais em larga escala devido à possibilidade de obtenção de maior quantidade de matéria-prima vegetal em menor tempo (Rout *et al.*, 2000; Hazarika, 2006). Outras vantagens da utilização de cultivo como fontes de metabólitos secundários residem no fato de as mesmas

serem independentes de variações geográficas e sazonais e de vários fatores ambientais; oferecerem sistemas de produção definidos que garantem o fornecimento, a uniformidade e a qualidade dos produtos e possibilitam a obtenção de substâncias que não são produzidas na planta matriz, bem como a biotransformação (Dicosmo & Misawa, 1995; Rachamandra Rao & Ravishankar, 2002).

As principais limitações dos processos biotecnológicos para produção de plantas estão ligadas ao alto custo de investimento necessário para a instalação dos equipamentos industriais, a manutenção da mão-de-obra especializada e a manutenção das condições de produção que exigem controle rígido de temperatura e luminosidade, bem como meios de cultura balanceados em termos de sais minerais, vitaminas e reguladores de crescimento, ao crescimento lento da biomassa vegetal, à falta da exsudação dos metabólitos pelas culturas e às dificuldades de preservação das condições axênicas por longos períodos (Fowler *et al.*, 1990; Herman, 1993; Trigiano & Gray, 2005).

Durante a última década, um considerável progresso foi atingido na pesquisa da biossíntese e do acúmulo de metabólitos secundários em culturas de células e de tecidos vegetais (Dixon, 1999; Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Como forma de otimizar o crescimento vegetal, bem como a produção de compostos de interesse, esforços têm sido realizados para aperfeiçoamento dos métodos de cultivo, como, por exemplo, o uso de biorreatores. Entre as possíveis aplicações em escala industrial, pode-se citar a produção de taxuianina C, paclitaxel e outros taxanos em culturas de células de *Taxus chinensis* (Wang & Zhong, 2002; Zhong, 2002) e a produção de saponinas ginsenosídicas e polissacarídeos em culturas de *Panax ginseng* (Jeong *et al.*, 2006; Thanh *et al.*, 2006).

Existem diversas estratégias para otimizar o crescimento das células e a produção de metabólitos em culturas de células vegetais, como, por exemplo, a variação de parâmetros físicos e químicos como a intensidade luminosa, a temperatura, o pH do meio de cultura, a agitação e a aeração, a adição de precursores ou intermediários da via biossintética, fitohormônios, anti-metabólitos e a utilização de elicitores bióticos (compostos que induzem respostas de defesa em células vegetais contra infecções microbianas), de elicitores de natureza abiótica (como radiação UV e íons de metais pesados) e a variação da composição química do meio de cultivo (Choi *et al.*, 2000; Rout *et al.*, 2000; Bourgaud *et al.*, 2001). Também é possível o melhoramento genético por meio da transferência de genes e a conseqüente obtenção de plantas transgênicas com características fenotípicas, fisiológicas ou bioquímicas alteradas, mais vantajosas sob o ponto de vista sócio-econômico (Dixon, 1999;

FAO, 2004).

Os meios de cultura utilizados no cultivo *in vitro* de plantas micropropagadas baseiam-se nas exigências nutricionais das plantas, com algumas modificações favoráveis ao desenvolvimento *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998). A literatura apresenta diferentes formulações nutritivas, como os meios White (1951), MS (Murashige & Skoog, 1962), LS (Linsmaier & Skoog, 1965) e Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968), sendo os meios MS e Gamborg B5 utilizados na cultura de tecidos da maioria das espécies. São compostos por uma mistura de macro e micro-nutrientes orgânicos e inorgânicos, fontes de ferro, vitaminas, fontes de carbono e reguladores de crescimento. Diferenciam-se pelas variações das concentrações dos nutrientes e podem ser otimizados, apresentando modificações qualitativas e quantitativas.

A manipulação do meio de cultura deve ser efetiva no aumento do crescimento ou da acumulação de metabólitos secundários, sendo a expressão de várias rotas metabólicas alteradas com a modificação da concentração de alguns nutrientes (Misawa, 1985; Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Dependendo da rota biossintética, diferentes substratos, precursores e cofatores adicionados ao ambiente ou ao meio em que a planta está se desenvolvendo tornam-se importantes para respostas de produção e crescimento. Os componentes comumente investigados, visando à otimização da produção *in vitro*, são a concentração e o tipo de fonte de carbono, a concentração de nitrogênio e de fosfato, além do tipo e da concentração de reguladores de crescimento (Fowler *et al.*, 1990; Rout *et al.*, 2000).

De um modo geral, o acúmulo de metabólitos secundários ocorre de maneira independente do crescimento, ou seja, em fases distintas, em que no primeiro estágio se estabelece o aumento de biomassa, e no segundo momento induz-se a produção. Para tanto, a otimização de meios de cultura para cada fase torna-se necessária.

O cultivo *in vitro* de culturas de órgãos e tecidos de espécies de valeriana tem sido investigado visando ao estudo e ao aumento da capacidade biossintética de produtos do metabolismo secundário (Becker & Schrall, 1980; Violon *et al.*, 1984; Milkova *et al.*, 1988; Mathur & Ahuja, 1991; Mathur, 1992; Enciso-Rodríguez, 1997; Kaur *et al.*, 1997; Banerjee *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2002; Salles *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004; Maurmann *et al.*, 2006; Russowski *et al.*, 2006).

Culturas *in vitro* de calos de *V. glechomifolia* foram estabelecidas a partir de folhas do vegetal em meios B5 e MS de cultura variando-se concentrações de macro e micro-nutrientes (Salles, 1999). Após um ano de cultivo, os extratos de calos obtidos nos meios de

cultura foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e os resultados demonstraram que todas as culturas mantiveram a capacidade biossintética de produção de acevaltrato, 1- β -acevaltrato, valtrato, DIA-valtrato e diidrovaltrato, sendo que os calos cultivados em meio B5 suplementado com 2,0mg/L de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) apresentaram a maior produção das substâncias. Além disso, algumas culturas produziram concentrações maiores de acevaltrato e 1- β -acevaltrato do que a planta *in natura*. O aumento da produção de acevaltrato também foi observado em culturas celulares de *Fedia cornucopiae*, *Centranthus ruber*, *Valerianella dentata*, *V. coronata* e *V. locusta* (Becker & Schroll, 1980).

Foram estabelecidas culturas de células em suspensão e de raízes não transformadas de *V. glechomifolia* originadas a partir de calos friáveis (Fig. 5a) e de raízes de plântulas micropropagadas (Fig. 5b), respectivamente, em meio MS suplementado com 1,0mg/L de ácido naftaleno acético (ANA) e com 0,1mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP) e em meio Gamborg (B5) suplementado com 1mg/L de 2,4-D e 0,2mg/L de cinetina (Maurmann *et al.*, 2006). Após um ano de cultivo, os teores de valepotriatos nas suspensões celulares foram quantificados por CLAE. Os resultados obtidos indicaram que culturas acumularam maiores teores de valepotriatos em meio Gamborg B5 suplementado com 1mg/L de 2,4-D e 0,2mg/L de cinetina na ausência de exposição à intensidade luminosa, e foi observada uma relação positiva entre crescimento e produção de valepotriatos em culturas de calos, de células em suspensão e de raízes (Maurmann *et al.*, 2006, anexo 1).

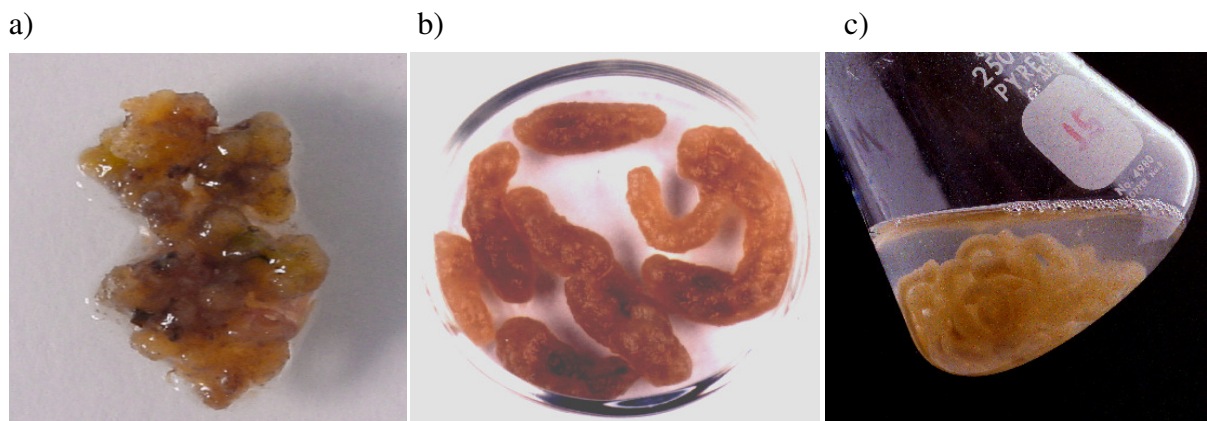


Figura 5. Culturas em meio líquido de *V. glechomifolia*. (a) Aspecto dos calos, (b) aspecto das raízes e (c) desenvolvimento das culturas de raízes em erlenmeyer. **Fonte:** Maurmann *et al.* (2003); Carvalho (2003); Maurmann *et al.* (2006).

O protocolo desenvolvido para a micropropagação de *V. glechomifolia* possibilitou a propagação da espécie e gerou plântulas com morfologia normal (Fig. 6). Os resultados da quantificação de valepotriatos nas plântulas micropropagadas demonstraram-se superiores aos teores da planta matriz, mantendo a maior concentração das substâncias nas partes aéreas (Salles *et al.*, 2002).

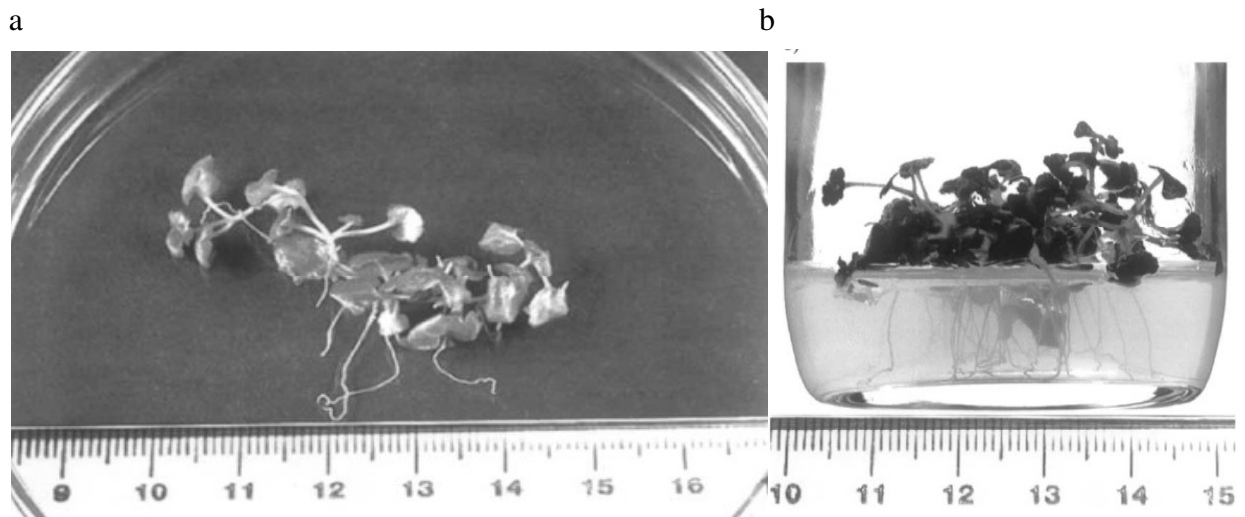


Figura 6. Aspecto de *V. glechomifolia*: (a) planta *in natura* e (b) micropropagadas em meio MS. Escala em centímetros. **Fonte:** Salles *et al.*, 2002.

Após estudo do processo de propagação de *V. glechomifolia*, Carvalho *et al* (2004) investigaram a otimização do enraizamento *in vitro*; para tanto foi procedida à aclimação *ex-vitro* com a transferência das plantas para casa de vegetação, demonstrando 100% de sobrevivência (Fig. 7).

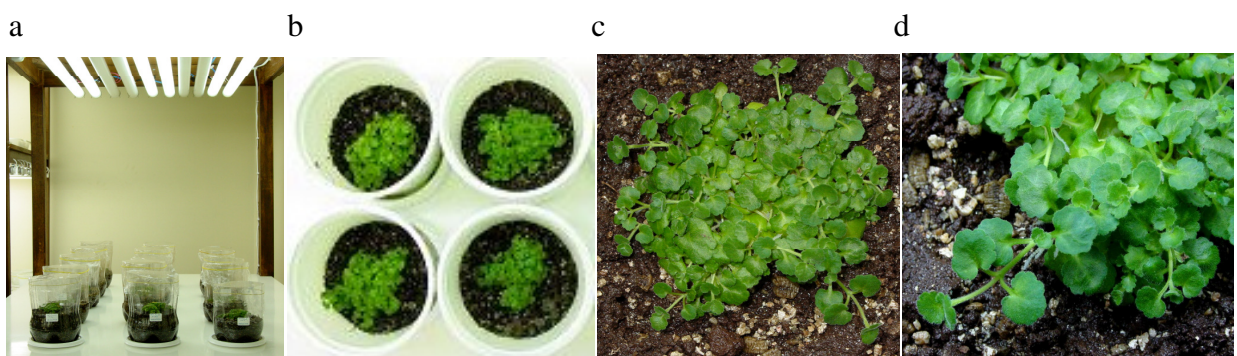


Figura 7. Desenvolvimento das plantas após 45 dias de transplântio para o solo (a) Aspecto da sala de cultivo e (b) plantas em crescimento nos potes com solo:vermiculita. (c) Planta aclimatada e (d) visualização com aproximação. **Fonte:** Carvalho (2003).

Dando continuidade ao trabalho de Carvalho *et al* (2004), as plantas foram mantidas na Faculdade de Agronomia e foram acompanhados o seu crescimento (Fig. 8a) e a produção de valepotriatos até o florescimento (Fig. 8b) (Vidal *et al.*, 2005).

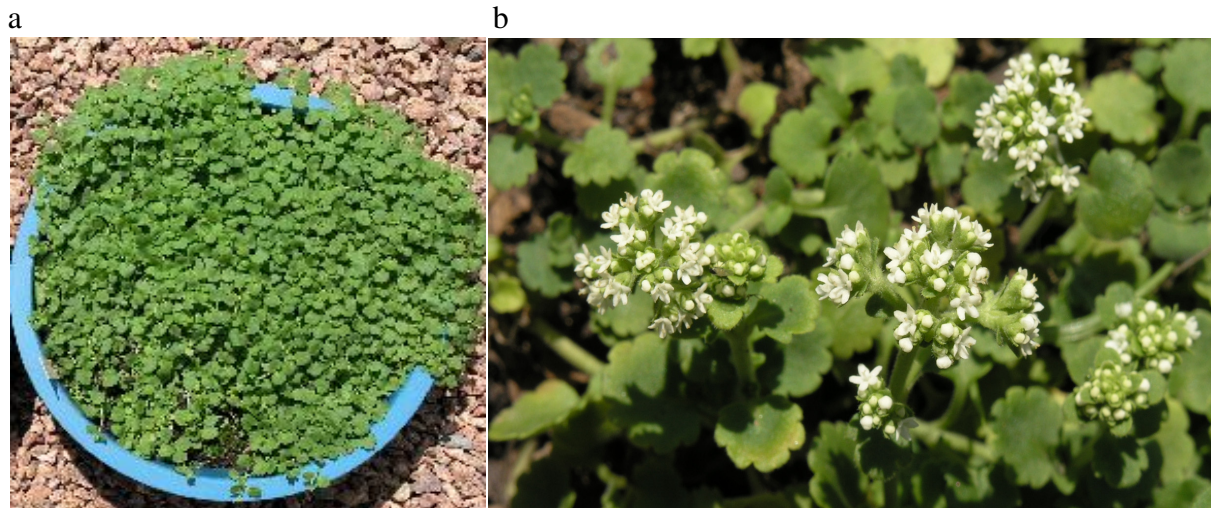


Figura 8. *V. glechomifolia* cultivada *ex-vitro*. (a) Aspecto da planta transplantada e (b) floração. **Fonte:** Vidal *et al.*, 2005.

Também foram realizados experimentos submetendo-se plantas micropropagadas inteiras cultivadas por 2 meses em meio semi-sólido MS a transplântio para meio nutritivo líquido (Fig. 9a,b) – um processo de cultivo alternativo para obtenção de biomassa e valepotriatos que demonstrou um aumento na produção de valepotriatos quando comparado ao cultivo em meio semi-sólido (Russowski *et al.*, 2006, anexo 2).

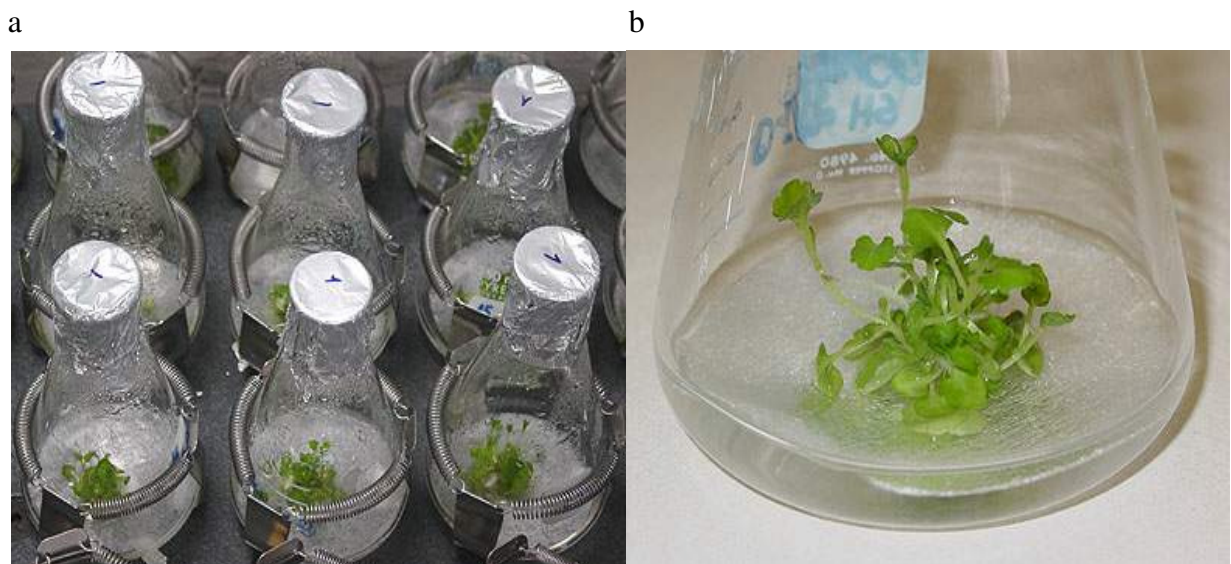


Figura 9. Cultivo de plantas inteiras de *V. glechomifolia* transferidas para meio líquido de cultivo. (a) Aspecto do cultivo e (b) detalhe da planta em frasco erlenmeyer. **Fonte:** Russowski, 2007.

Os estudos do cultivo *in vitro* de *V. glechomifolia* têm sido conduzidos por grupos de pesquisa vinculados à Faculdade de Farmácia e ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Salles *et al.*, 2000; Salles *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004; Russowski *et al.*, 2006; Maurmann *et al.*, 2006). As metodologias de

cultivo *in vitro*, além de permitirem o incremento da produção de metabólitos secundários pelos vegetais, viabilizam a produção em massa de plantas e o melhoramento e conservação das espécies. Isto é extremamente relevante para a espécie *V. glechomifolia*, que é uma planta de pequeno porte, sensível a variações climáticas e edáficas e de ocorrência restrita, encontrando-se somente na região fisiográfica dos Campos de Cima da Serra, nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Sobral, 1999a).

II. Objetivos

Visou-se avaliar a produção de valepotriatos e o crescimento *in vitro* de plantas de *Valeriana glechomifolia* cultivadas em meio de cultura baseado na formulação de Murashige & Skoog (1962) com diferentes concentrações de nutrientes e sob cultivo de longo prazo. Com o intuito de verificar o efeito farmacológico de um extrato enriquecido de valepotriatos de *V. glechomifolia*, foram examinados alguns parâmetros neuro-comportamentais em camundongos. Para ordenar os assuntos abordados, o trabalho está apresentado na forma de dois artigos, a seguir:

No Artigo 1 estão apresentados os resultados dos experimentos de cultivo *in vitro* de plantas de *V. glechomifolia* Meyer, variando as concentrações de nutrientes do meio de cultura MS, para estudo dos efeitos no crescimento e na produção de valepotriatos.

No Artigo 2 está esboçado o estudo inicial do efeito neuro-comportamental em camundongos de um extrato clorofórmico semi-purificado de *V. glechomifolia*, enriquecido de valepotriatos, para avaliação das atividades biológicas de valepotriatos.

III. Artigo 1

No Artigo 1 estão apresentados os experimentos realizados de cultivo *in vitro* de plantas de *Valeriana glechomifolia* Meyer, variando as concentrações de nutrientes do meio de cultura Murashige & Skoog (1962), para avaliação dos efeitos das variações em diferentes parâmetros crescimento (massa fresca, índice de crescimento, número de folhas e número de raízes) e na produção dos valepotriatos majoritários (valtrato, diidrovaltrato e acevaltrato). Este artigo foi enviado para publicação para a revista *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*.

Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*

Natasha Maurmann · Sandra Beatriz Rech · Arthur Germano Fett-Neto

Editor: G. C. Phillips

© The Society for In Vitro Biology

Abstract *Valeriana glechomifolia*, a southern Brazilian endemic species commonly known as Valerian, accumulates the bioactive terpene derivatives valepotriates in all of its organs. *In vitro* growth of *V. glechomifolia* on solid Murashige and Skoog (MS) without phytohormones at full, 75% (MS 75), or on a modified formulation (M Δ) was compared in stock cultures kept for up to 9 mo. without subculture. Changes in biomass accumulation, development of roots and shoots, and the production of the valepotriates acevaltrate, didrovaltrate, and valtrate were monthly evaluated. The highest biomass accumulation and root development was observed in plants grown on M Δ , whereas better leaf development was detected in M- Δ - and MS-medium-grown plants after 8 and 9 mo. of culture, respectively. Maximal didrovaltrate and valtrate yields were observed in M- Δ -grown plants harvested after 5 and 6 mo. of culture, respectively, whereas acevaltrate concentration was highest on M- Δ - and MS-75-grown plants after 7 mo. of culture. Plants grown for 6 mo. without subculture in M Δ were successfully propagated, showing stable growth and valepotriate yields three- to sixfold higher than those observed in field-grown plants. The results showed a positive effect of combined moderate reduction in salt concentration and increases in selected micronutrients and

myo-inositol amounts on both growth and valepotriate yields of extended period stock cultures of *V. glechomifolia*.

Keywords Prolonged cultivation · Valerian · Acevaltrate · Valtrate · Didrovaltrate

Introduction

Due to their medical interest as a sedative phytomedicine, rhizomes of different *Valeriana* species have been overharvested (Castillo et al. 2000). Pharmacological properties of *Valeriana* species (sedative, fungicidal, and antitumoral) have been attributed to various components, such as valepotriates, valerenic acids, borneol derivatives, and flavonoids (Fuzzati et al. 1996; Houghton 1999; Fernández et al. 2006). As an alternative to obtain active compounds of pharmaceutical interest, *in vitro* production has been evaluated, mostly in differentiating callus cultures and various tissues from some Valerianaceae such as *Valeriana officinalis*, *Valeriana wallichii*, *Centranthus ruber*, and *Centranthus macrosiphon* (Becker and Schrall 1980; Violon et al. 1984).

Valeriana glechomifolia Meyer, a species of the family Valerianaceae, is indigenous to southern Brazil (Sobral 1999) and is currently enlisted as an endangered species (IBAMA 1992). *V. glechomifolia* is capable of accumulating in all of its organs the terpene derivatives valepotriates, and aerial parts of this species are richer in valepotriates than the subterranean organs (Salles et al. 2000; Silva et al. 2002) in contrast to other valerian-derived phytomedicine sources, which consist primarily of the roots (Houghton 1999). *V. glechomifolia* has numerous small leaves and roots, displaying a stoloniferous habit and covering areas of soil in elevated areas, particularly in rocky fields.

N. Maurmann · A. G. Fett-Neto (✉)
 Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular,
 Centro de Biotecnologia, UFRGS,
 Caixa Postal 15005,
 91501-970 Porto Alegre, Brazil
 e-mail: fettneto@cbiot.ufrgs.br

S. B. Rech
 Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS,
 Av. Ipiranga, 2752,
 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

A protocol for micropropagation of *V. glechomifolia* has been established and the valepotriates accumulated quantified (Salles et al. 2002). Further studies analyzed the growth kinetics and the influence of the auxins indole-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, and α -naphthaleneacetic acid in micropropagated *V. glechomifolia* and survival under *ex vitro* conditions after plant acclimatization (De Carvalho et al. 2004). Production of valepotriates has also been studied in *V. glechomifolia* tissue cultures, such as callus, cell suspension, and root cultures (Maurmann et al. 2006); the roles of light and medium composition on growth and valepotriate contents in whole plants cultured in liquid medium were also investigated (Russowski et al. 2006).

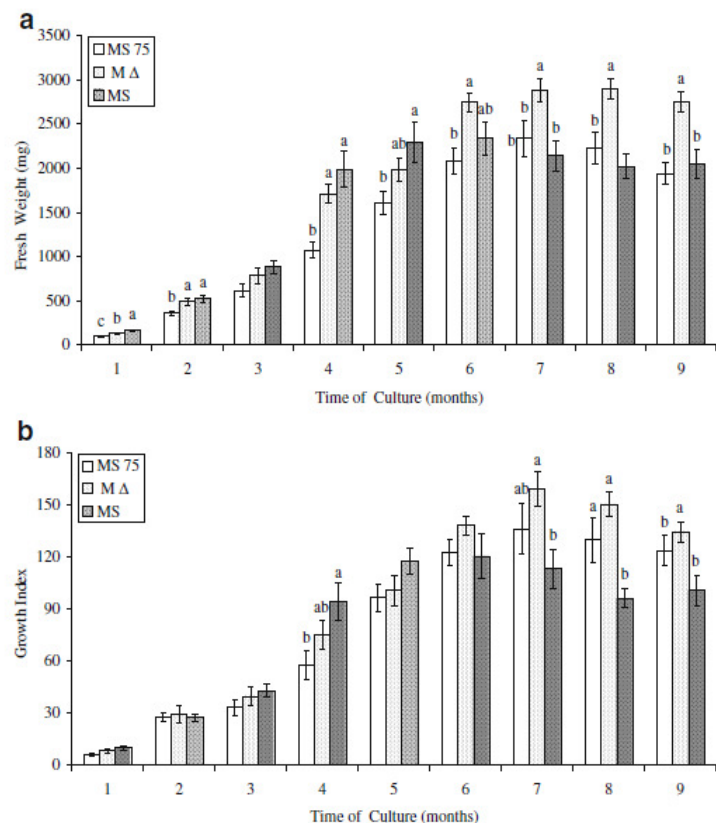
In this work, we present information on the optimization of growth, development of roots and leaves, and valepotriate production in micropropagated *V. glechomifolia*, cultivated on three different nutrient formulations as stock cultures for 9 mo. The main purpose of this investigation was to optimize nutrient composition for valepotriate and biomass accumulation in long-term maintenance cultures. Moreover, the effect of the physiological age of mother plantlets cultured *in vitro* for 6 mo. was studied on successive subcultures and the valepotriate contents analyzed.

Materials and Methods

Chemicals. External standards of valepotriates [acevaltrate (ACE), didrovaltrate (DID), and valtrate (VAL)] were isolated from *V. glechomifolia* and purified by prep-LC using the procedure described by Salles et al. (2000). All solvents used for chromatographic purposes were high performance liquid chromatography (HPLC) grade. Other solvents were reagent grade or equivalent.

Plant material and culture conditions. Shoot tips (1.5-cm long) isolated from 2-mo.-old micropropagated *V. glechomifolia* were obtained following the protocol described by Salles et al. (2002) without the inclusion of polyvinylpyrrolidone in the culture medium. Plants used in the experiments were grown on modified MS medium (Murashige and Skoog 1962), named M Δ , containing 75% of the original strength of MS macro-nutrients: KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 ; 75% of original strength the following MS micro-nutrients: $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 150% of the original strength of the following MS micro-nutrients: KI, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, and 150% of

Figure 1. Growth of *V. glechomifolia* plants cultured on MS 75, M Δ , and MS medium containing 3% sucrose for 9 mo. (a) Fresh weight (mg) and (b) growth index (GI). Values are means of three different experiments. Bars Means \pm SE. Bars without letters or sharing a letter within each month are not significantly different by a Duncan test at $P < 0.05$



IMPROVED NUTRIENT MEDIUM IN *Valeriana glechomifolia* CULTURES

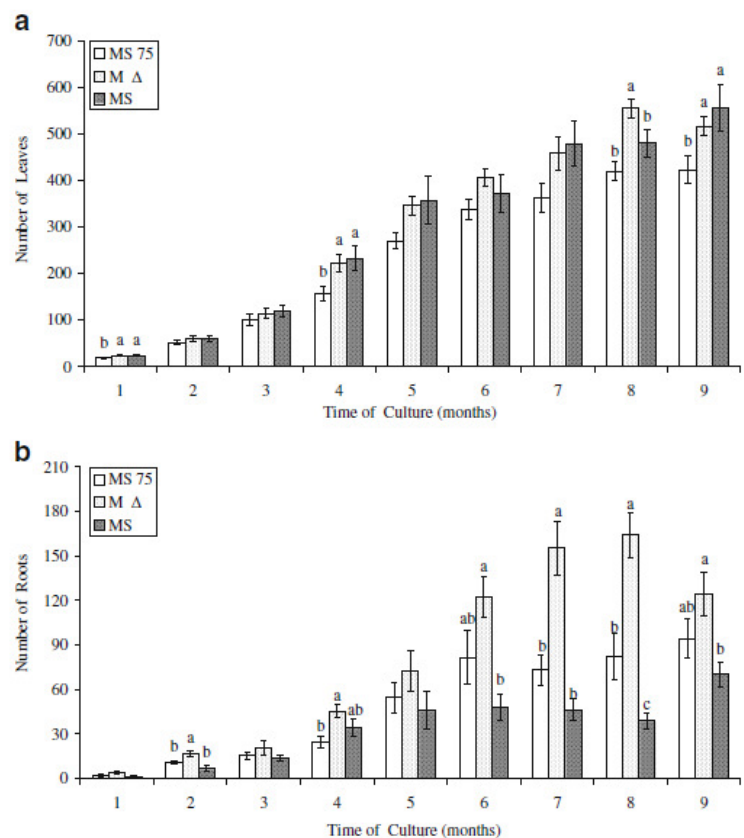
the original concentration of myo-inositol, compared to standard MS formulation. All salts were analytical grade (Sigma, Saint Louis, MO). The media were supplemented with 3% (*w/v*) sucrose (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). The pH was adjusted to 5.8, and media were solidified with 0.6% agar (extra pure, Merck, Darmstadt, Germany). The choice of the micronutrients I, Mo, Cu, and Co as components with increased concentration in the modified medium was based on their general lack of effect on tobacco callus growth within a range of various concentrations in the original study of Murashige and Skoog (1962) and, hence, their potential to modulate metabolism without affecting growth. The choice of myo-inositol as an organic constituent to be added at an increased concentration was based on its potential effects on endogenous auxin homeostasis (Ljung et al. 2002; Loewus and Murphy, 2000), as this phytohormone has been shown to be important for stable valepotriate production (De Carvalho et al. 2004).

Media (25 ml aliquots) were placed in 150-ml glass flasks and capped with two layers of aluminum foil. Plants generated within 2 mo. after inoculation were transferred to the same fresh medium (M Δ), to full strength MS medium

(MS), or to diluted MS containing three quarters (75%) of the original concentration of inorganic salts (MS 75). These plants were maintained for three cycles of 2 mo. each, with subculture to the corresponding medium at the end of each cycle, using individual shoot tips as explants. All media were sterilized by autoclaving at 121°C and 1.5 atm for 20 min after the addition of all components. The cultures were maintained at 25±3°C under a 16/8-h (day/night) photoperiod with light provided by cool-white fluorescent lamps (Osram, São Paulo, Brazil) at an intensity of approximately 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Upon completion of the three passages on the appropriate media for adaptation to the specific medium conditions, explants of *V. glechomifolia* containing the apical meristem were removed. The average initial fresh weight of the explants ($n=451$) was determined before the initiation of the long-term maintenance experiment, in which the plants remained for 9 mo., without transference to fresh medium. Within the 9-mo. time frame of the long-term maintenance experiment, plant growth (1) and valepotriate contents (2) were monthly evaluated. Plants cultured *in vitro* for 6 mo. in M Δ were subcultured in the same medium and grown for

Figure 2. Development of leaves and roots of *V. glechomifolia* plants cultured on MS 75, M Δ , and MS medium containing 3% sucrose for 9 mo. (a) Leaf number and (b) root number. Values are means of three different experiments. Bars Means±SE. Bars without letters or sharing a letter within each month are not significantly different by a Duncan test at $P<0.05$



the same period of time under the same conditions described above. After three periods of 6 mo. of *in vitro* culture, plant growth and valepotriate contents were evaluated.

Growth analysis. Every month, fresh biomass was measured (FW) after removing the adhering culture media with a filter paper. The numbers of leaves and roots were recorded, and the whole plants were freeze-dried for dry weight (DW) determination and valepotriate analysis. Roots (whitish and clearly polarized cylindrical structures) were counted when longer than 2 mm. Lateral roots (root ramifications) were included in the counting.

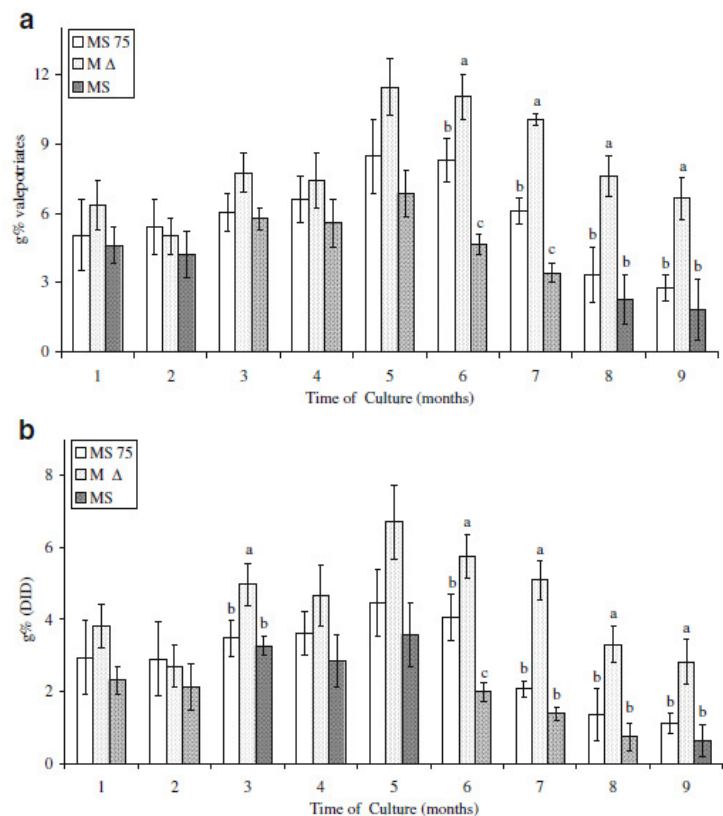
Although an effort was put on using similar explant sizes to start the experiment, to minimize differences in growth that may have been the result of variation in initial explant size, the Growth Index (GI) = $(\text{weight}_{\text{final}} - \text{weight}_{\text{initial}}) / \text{weight}_{\text{initial}}$ was also used to evaluate growth.

Valepotriate determinations. Freeze-dried plants were extracted according to the method described by Salles et al. (2002). The powdered material was extracted four times at room temperature with chloroform, under 20-min sonication

(Ultrasonic[®], São Paulo, Brazil). The extract was dissolved in methanol to obtain a concentration of 1 mg/ml, filtered through a membrane filter (0.22 μm pore size, Merck), and analyzed by HPLC. HPLC analysis of valepotriates was performed as previously reported (Silva et al. 2002), in a Shimadzu equipment coupled to an LC-10AD pump, an SPD-10A UV detector and an automatic injector (SIL-10^A), with a 20 μl sample loop. The separation conditions were: column, Nova-Pack C18 Waters (4 μm , 3.9 \times 150 mm i.d.), attached to a guard column, Nova-Pack C18 Waters 60A (3.9 \times 20 mm); mobile phase, CH₃CN/H₂O, 50:50 (v/v); flow rate, 1 ml min⁻¹; detector sensitivity, 1.0 Auf; detection at 208 nm (monoenic valepotriate) with retention times of 19.8 min (DID) and 254 nm (dienic valepotriates) with retention times of 18.1 min (ACE) and 34.8 min (VAL). Valepotriate contents were expressed as a percentage of the freeze-dried weight of the plants.

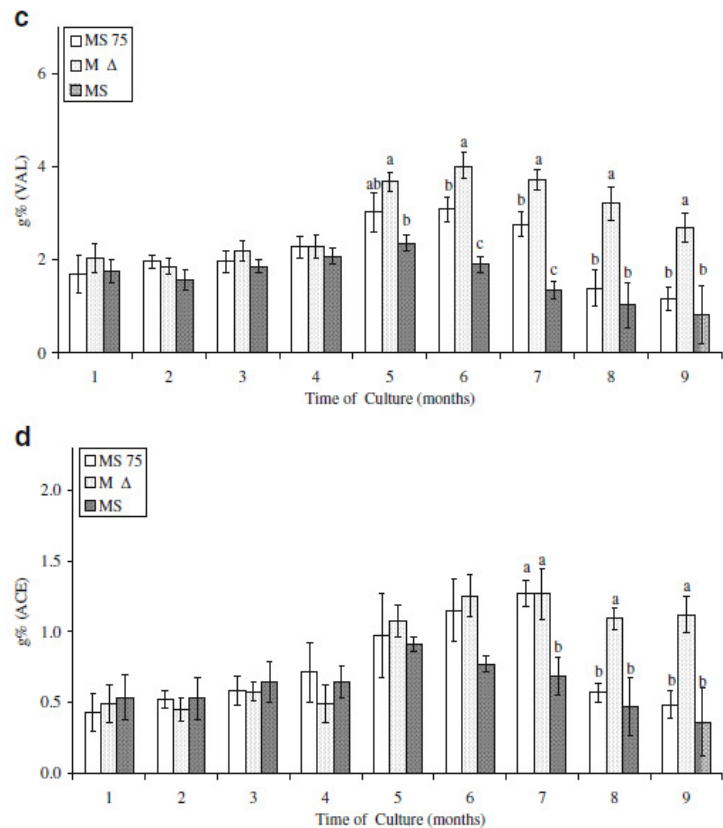
Statistical analysis. In all of the experiments, the layout was completely randomized. All treatments had at least four replicates, and the experiments were independently carried out three times. One-way analysis of variance within each

Figure 3. Time-course of valepotriate production of *V. glechomifolia* plants cultured in MS 75, M Δ , and MS medium containing 3% sucrose. (a) VAL + ACE + DID, (b) DID, (c) VAL, and (d) ACE. Values are means of three different experiments. Bars Means \pm SE. Bars without letters or sharing a letter within each month are not significantly different by a Duncan test at $P \leq 0.05$



IMPROVED NUTRIENT MEDIUM IN *Valeriana glechomifolia* CULTURES

Fig. 3 (continued)



sampling time, followed by Duncan test when appropriate, was applied with a critical value of $P \leq 0.05$ (Sokal and Rohlf 1981).

Results and Discussion

In vitro growth. *V. glechomifolia* plants grew and accumulated valepotriates in all of the media formulations tested. During 9 mo. without subculture, significant increases of biomass were observed (Fig. 1a) and higher numbers of leaves and roots were produced, especially the former (Fig. 2a,b). The overall growth response of plants to the three media was similar. Nevertheless, plants grown on MS medium displayed faster biomass increase (up to the sixth month of culture) and growth decline afterwards (Fig. 1a), whereas plants grown on MS 75 and M Δ reached their maximum biomass after 7 and 8 mo. of growth, respectively.

Largest FW (2.89 ± 0.03 g) and GI values (159.23 ± 45.83 ; Fig. 1a,b), as well as the highest number of roots (164.06 ± 61.99 ; Fig. 2b) were obtained on M Δ after 8 (FW and roots) and 7 (GI) mo. of culture. Plants grown on MS

75 and MS showed a trend toward intermediate and lower growth responses, respectively, compared to M Δ.

Plants cultured on diluted medium (MS 75) displayed maximum FW (2.34 ± 0.61 g) and GI (136.06 ± 43.39) after 7 mo. of culture and decreased afterwards (Fig. 1a,b). The highest number of leaves (422.75 ± 116.48) and roots (94.31 ± 52.74) were observed after 8 or 9 mo. of culture respectively (Fig. 2a,b).

Plants grown on MS medium displayed maximum FW (2.34 ± 0.56 g) and GI (120.34 ± 39.02) after 6 mo. of culture (Fig. 1a,b), whereas the highest number of leaves (556.20 ± 192.59) and roots (70.27 ± 33.38) were recorded after 9 mo. of culture (Fig. 2a,b).

Valepotriate accumulation. Maximum total valepotriate contents were observed in plants kept on the three media after 5 mo. of *in vitro* culture (11.47 ± 2.70 g% DW—M Δ; 8.46 ± 3.22 g% DW—MS 75; 6.86 ± 2.00 g% DW—MS; Fig. 3a). For plants cultivated in MS medium, the total valepotriate yields (Fig. 3a) and the individual valepotriates DID, VAL, and ACE (Fig. 3b–d) seemed to follow closely the growth of the plants, increasing up to Month 5 and decreasing on the subsequent mo (Figs. 1a and 3a).

In MS-75- and M- Δ -grown plants, the highest production of valepotriates occurred after 5 mo., a period within which the plants had not reached maximum biomass. Metabolite production remained constant after 6 mo. and started a moderate decrease after 7 mo., which was intensified on the subsequent mo (Figs. 1a and 3a). Overall, the results confirmed a direct relationship between growth and valepotriate yield.

The comparative analysis of individual and total valepotriate production within each month of analysis between MS and MS 75, which differ only in the concentration of inorganic salts, shows statistically equivalent yields for most of the time points evaluated, except for Months 6 and 7 for total valepotriates and VAL, Month 7 for ACE, and Month 6 for DID (Fig. 3). In each of these instances, MS 75 plants yielded higher amounts of valepotriates. In contrast to the relatively similar valepotriate yields in plants grown in MS and MS 75 media, M- Δ -grown plants had higher content of total valepotriates than the other two media after 6, 7, 8, and 9 mo. of culture (Fig. 3a). The same pattern was observed for DID and VAL (Fig. 3b,c), whereas for ACE, M- Δ -grown plants had higher content after 8 and 9 mo. (Fig. 3d).

The media M Δ and MS 75 differ in the composition of myo-inositol and micronutrients, which showed relatively minor effects on tobacco callus growth assays described in the classic work of Murashige and Skoog (1962); these components are present at 1.5 \times higher concentration in M Δ . The higher content of myo-inositol may have affected auxin homeostasis (Ljung et al. 2002), perhaps stimulating growth and valepotriate metabolism (De Carvalho et al. 2004). The increased content of selected micronutrients could have caused a mild but chronic oxidative stress response potentially capable of inducing valepotriate accumulation. Reactive oxygen species have been shown to trigger the production of various secondary metabolites, including terpenes (Zhao et al. 2005).

A first examination of the results might suggest that root development was correlated with the higher accumulation of valepotriates in M- Δ -grown plants. However, this is unlikely because at Months 6 and 9, M- Δ -grown plants had equivalent number of roots as plants grown in MS 75 but significantly higher amounts of DID, VAL, and total valepotriates (Fig. 2b and Fig. 3a–c). Similarly, at Months 2 and 4, M- Δ -grown plants had more roots than those from M 75, but no significant increase in valepotriate was detected. Furthermore, in Month 8, M- Δ -grown plants had the highest number of roots, whereas the highest total valepotriate amounts were observed in Months 5 and 6 (Figs. 2b and Fig. 3a).

V. glechomifolia prolonged *in vitro* cultivation and valepotriate accumulation. The mass propagation achieved in long-term

cultivation showed that successive subcultures had no adverse effect on plantlet vigor. Plants cultured *in vitro* for 6 mo. in M Δ subcultured in the same medium and grown for the same period of time for three rounds displayed stable increases in biomass (2.97 ± 0.87 g) and total valepotriate content (9.74 ± 0.05 g% DW). Therefore, the method outlined in this study provides a large clonal population that retains the physiological characteristics and metabolic profile of the species.

The major valepotriate quantified in plants grown in the three media was DID (Fig. 3), followed by VAL and ACE. Valepotriate contents throughout the cultivation period were higher than those reported for field-grown intact plants of *V. glechomifolia*. Field-grown plants of *V. glechomifolia*, collected in the spring in the state of Rio Grande do Sul, yielded about 2% of total valepotriates, with a predominance of ACE, VAL, and DID (Silva et al. 2002). Therefore, M Δ medium contained enough nutrients to support a growth cycle of 6–7 mo. for *V. glechomifolia* plants, and these long-term cultured plants were capable of accumulating a higher concentration of total valepotriates than field-grown plants with a similar composition profile.

The overall results confirm, for long-term cultures in solid media, the direct relationship between growth and valepotriate production previously established for shorter term whole-plant, cell and root cultures of *V. glechomifolia* grown in liquid media (Maurmann et al. 2006; Russowski et al. 2006). Moreover, the media modifications in M Δ were able to significantly enhance growth and production of valepotriates, maintaining physiological viability and providing an adequate formulation for long-term stock cultures.

Acknowledgments The authors are grateful to the Brazilian agencies CAPES, CNPq, and FAPERGS for financial support. We would also like to thank Prof. Dr. Pedro R. Petrovick (Faculdade de Farmácia, UFRGS) for lending the HPLC equipment.

References

- Becker H., Schroll R. Valepotriates in tissue cultures of nine different Valerianaceae species in comparison to literature data of the intact plants. *J Nat Prod* 43: 721–723; 1980.
- Castillo P., Márquez J., Rubluo A., Hernández G., Lara M. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Sci* 151: 115–119; 2000.
- De Carvalho C. M. B., Maurmann N., Luz D. I., Fett-Neto A. G., Rech S. B. Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Rep* 23: 251–255; 2004.
- Fernández S. P., Wasowski C., Paladini A. C., Marder M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol* 539: 168–176; 2006.
- Fuzzati N., Wolfender J. L., Hostettmann K., Msonthi J. D., Mavi S., Molleyres L. P. Isolation and antifungal valepotriates from

- Valeriana capense* and the search for valepotriates in crude Valerianaceae extracts. *Phytochem Anal* 7: 76–85; 1996.
- Houghton P. J. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *J Pharm Pharmacol* 51: 505–512; 1999.
- IBAMA (1992) Espécies da flora ameaçadas de extinção, <http://www.ibama.gov.br/flora/home.htm>, Portaria n. 37, cited 03 Apr 1992.
- Ljung K., Hull A. K., Kowalczyk M., Marchant A., Celenza J., Cohen J. D., Sandberg G. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 49: 249–272; 2002.
- Loewus F., Murphy P. Myo-inositol metabolism in plants. *Plant Sci* 150: 1–19; 2000.
- Maurmann N., De Carvalho C. M. B., Silva A. L., Fett-Neto A. G., Von Poser G. L., Rech S. B. Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 50–53; 2006.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497; 1962.
- Russowski D., Maurmann N., Rech S. B., Fett-Neto A. G. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 86: 211–218; 2006.
- Salles L. A., Silva A. L., Fett-Neto A. G., Von Poser G. L., Rech S. B. *Valeriana glechomifolia*: *In vitro* propagation and production of valepotriates. *Plant Sci* 163: 165–168; 2002.
- Salles L. A., Silva A. L., Rech S. B., Zanatta N., Von Poser G. L. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochem Syst Ecol* 28: 907–910; 2000.
- Silva A. L., Rech S. B., von Poser G. L. Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to south Brazil. *Planta Med* 68: 570–572; 2002.
- Sobral M. E. G. Valerianaceae. *Boletim do Instituto de Biociências, UFRGS* 58: 1–61; 1999.
- Sokal RR., Rohlf F. J. *Biometry*. Freeman, San Francisco; 1981.
- Violon C. J., Dekegel D., Verduyck A. Relation between valepotriate content and differentiation level in various tissues of Valerianaceae. *J Nat Prod* 47: 934–940; 1984.
- Zhao J., Davis L. C., Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotech Adv* 23: 283–333; 2005.

IV. Artigo 2

Este artigo foi escrito para obtenção do crédito de redação científica. Apresenta os resultados iniciais de experimentos pré-clínicos realizados em colaboração com o grupo do Dr. Rafael Roesler para investigação da atividade biológica de um extrato enriquecido de valepatriatos de *V. glechomifolia* injetados intraperitonealmente em camundongos.

Neuropharmacological profile of extracts with valepotriates of *Valeriana glechomifolia* in mice

Natasha Maurmann • Gustavo Kellermann Reolon • Sandra Beatriz Rech
Arthur Germano Fett-Neto • Rafael Roeler

N. Maurmann* • G.K. Reolon • A.G. Fett-Neto • R. Roesler
Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501.970 Porto Alegre, RS, Brazil

* e-mail: natasha.maurmann@ufrgs.br

S. B. Rech
Graduate Program in Pharmacist Science, Federal University of Rio Grande do Sul, 90610.000 Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

An extract containing a mixture of valepotriates of *Valeriana glechomifolia* (Valerianaceae, endemic of southern Brazil) was evaluated in neurobehavioral parameters. Adult mice were treated with doses of 1, 3 and 10 mg/kg or vehicle, 30 minutes before tests. During exploration of an open field, mice treated with 10 mg/kg showed reduced locomotion, and reduced exploratory behavior (number of rearings), compared to control animals. The extracts with valepotriates (EV) did not induce alterations in anxiety. All groups performed normally in a novel object recognition memory task except the group receiving 3 mg/kg dose, which showed alterations in novel object recognition memory. The results indicate that mice treated with valepotriates presented no deficits in long-term memory for aversive training and presented an impairment in novel object recognition memory task only at 3 mg/kg and possible sedative proprieties at 10 mg/kg.

Key words

Valerianaceae, Valepotriates, Memory, Behavior, Pharmacology, Central Nervous System.

Introduction

Different species of the genus *Valeriana* are widely known around the world, and their medical properties have been described in Europe for many centuries (Bach *et al.*, 1993). The phytopharmaceutical agents most frequently used for the treatment of insomnia and anxiety

are preparations of the subterranean parts of *Valeriana officinalis* (Houghton, 1999; Herrera-Arellano *et al.*, 2001), but the evidences for effects of valerian on the CNS are inconclusive (Trease & Evans, 1984; Stevinson & Ernst, 2000; Carlini, 2003).

Over 100 constituents of valerian have been identified, their concentrations are subject to seasonal variation (Bos *et al.*, 1998) and many may be potentially physiologically active (Block *et al.*, 2004). Currently, there is no scientific agreement on the mechanism of action of sedating activity or the compounds responsible the effects of valerian (Plushner, 2000; Cass, 2004; Dietz, 2005). Valerianaceae are known for having high concentration of 2 major groups of constituents, the mono- and sesquiterpenoids (hydrophilic valerenic acids and the hydrophobic valepotriates), which may account for its activity on the CNS (Morazzoni & Bombardelli, 1995; Backlund & Moritz, 1998; Houghton, 1999; Gao & Björk, 2000).

The valepotriates (valerian-Epoxy-Triesters) are a group of unusual lipophilic iridoids having a cyclopenta[c]pyranoid skeleton with an epoxy ring and 3 ester linkages rather than the glycosidic linkages found in most iridoids (Houghton, 1999).

The role of valepotriates in the sedative effect is somewhat controversial (Marder *et al.*, 2003). Their degradation products, baldrinals, may account for valerians' sedative effect (Wagner, 1980; Veith *et al.*, 1986). The central depressant action could not be demonstrated by a reduction of the glucose turnover in rat brain, a known test to detect activity in the CNS (Hölzl, 1997). Valepotriates have low stability, are thermolabile and decompose rapidly under acidic or alkaline conditions in water, as well as in alcoholic solutions (Bos *et al.*, 2002) and the resulting baldrinals are chemically reactive and may form polymers (Bos *et al.*, 1997), hence both valepotriates and baldrinals disappear rapidly from the extracts (Marder *et al.*, 2003). The roots and rhizomes of different valerian species show large differences with regards to their constituents (Houghton, 1999).

In mice, intraperitoneal injections of valerenic acid, valerenal and whole herb extracts produced significant sedation, ataxia and anticonvulsant effects (Hendriks *et al.*, 1981). Valerian root extract reduced motility and increased thiopental and pentobarbital-induced sleeping time, and in comparison with diazepam and chlorpromazine, valerian extract had weak anticonvulsive properties (Leuschner *et al.*, 1993; Hiller, 1996). Even the aroma of valerian root exerted sedative effects (Buchbauer *et al.*, 1992).

Unlike diazepam, valerian did not affect spontaneous locomotion and rearing or approach-avoidance conflict in a water-lick conflict test. On the other hand, valerian and imipramine significantly inhibited immobility induced by a forced swimming test in rats and significantly reversed reserpine-induced hypothermia in mice, leading researchers to conclude

that valerian may be a useful antidepressant (Sakamoto *et al.*, 1992). Valepotriates suppressed symptoms associated with diazepam withdrawal in rat (Andreatini & Leite, 1994). Cats given 10 mg/kg of a valerian extract by gastric gavage had a significant decrease in restless, fearful and aggressive behaviors (Voneickstedt, 1969).

V. glechomifolia Meyer is an herb that grows in rocky fields in a small geographic area of southern Brazil (Salles *et al.*, 2002). From nine *Valeriana* species distributed in southern Brazil (Sobral, 1999), *V. glechomifolia* is the richest in valepotriates (Silva *et al.*, 2002), found in both aerial and subterraneous parts of the plant (Salles *et al.*, 2000).

V. officinalis contains a higher concentration of terpenes, of which valerenic acid is perhaps the most important indicator compound (Morazzoni & Bombardelli, 1995). Both *V. glechomifolia* and *V. officinalis* contain valepotriates; *V. glechomifolia* contains high concentrations of valepotriates (Salles *et al.*, 2000; Silva, *et al.*, 2002; Maurmann *et al.*, 2006; Russowski *et al.*, 2006).

As an alternative to obtain plant material, we studied the growth kinetics of micropropagated *V. glechomifolia* in continuous presence of 5.71 μ M of auxine indole-3-acetic acid that yielded plants with stable levels of valepotriates (Carvalho *et al.*, 2004). Production of valepotriates have also been studied in tissue cultures: callus, cell suspension and root cultures (Maurmann *et al.*, 2006) as well as the role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *V. glechomifolia* whole plant liquid cultures (Russowski *et al.*, 2006).

However, a detailed behavioral analysis of the effect in mice of *V. glechomifolia*, containing valepotriates has not been previously reported, neither valepotriates effects in memory. In the present study, we investigated open field behavior, memory for aversive training, and recognition object memory in CF1 mice.

Materials and Methods

Plant material

Plants of *V. glechomifolia* Meyer were collected in the city of São José dos Ausentes, in region of Aparados da Serra, state of Rio Grande do Sul, Brazil, in April 1998. The species was identified by M. Sobral and a voucher specimen (Sobral, 7733) is deposited in the Herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN). The plants were immediately freezing, and then lyophilized, powdered and kept in freezer (-20°C).

Preparations of chloroform extracts of valerian

Valerian extracts were prepared from dried powdered underground parts of *V. glechomifolia*. Lyophilized aerial and subterranean parts of the plant were crushed to a particle size smaller of 850µm. Approximately 100g dry weight was extracted with 500ml of chloroform 2 times of 15 min using a sonication bath (Ultrasonic[®], São Paulo, Brazil) at 25°C. The extract was filtered through a glass filter and the filtrate was evaporated on a rotary evaporator under vacuum evaporation to dryness at 40°C, yielding 4.21g of chloroformic extract.

Obtainment of semi-purified EV

To obtain an enriched valepotriate extract (EV), the dried chloroform extract of *V. glechomifolia* was separated by silica gel vacuum column chromatography with hexane and chloroform gradient. The fraction containing valepotriates was monitored by preparative TLC (5x5cm glass plate coated with 0.5mm layers of silica gel GF254; bands were detected in UV light 254nm) with chloroform: methanol (50:0.5) as eluent (Salles *et al.*, 2000). The EV was concentrated and used on behavior tests.

Valepotriate determinations

The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis of valepotriates contained in EV was performed according to the previously procedure reported (Silva *et al.*, 2002). The EV (3x5mg) was dissolved in methanol to obtain a concentration of 1 mg/ml, filtered through a membrane filter (0.22µm pore size, Merck) and analyzed by HPLC (Shimadzu equipment coupled to a LC-10AD pump, a SPD-10A UV detector and an automatic injector, SIL-10^A, with a 20µl sample loop). The conditions were: column Nova-Pack C18 Waters (4µm, 3.9x150 mm i.d.) adapted to a guard column Nova-Pack C18 Waters 60A (3.9x20 mm); mobile phase CH₃CN/H₂O 50:50 (v/v); flow rate 1ml.min⁻¹; detector sensitivity 1.0 AUFs; detection at 208nm (for monoenic valepotriate DID, with retention times of 19.8min) and 254nm (dienic valepotriates, with retention times of 18.1min - ACE, and 34.8min - VAL). The valepotriates used as external standards were isolated as described elsewhere (Salles *et al.*, 2000). The EV contains 96% of valepotriates (1.66±0.05mg of VAL, 1.10±0.01mg of ACE and 2.05±0.11mg of DID).

Drug, doses and drug administration

The EV mixture containing 41% DID, 33% VAL and 22% ACE was suspended in saline solution, with Tween-80, 5.0% (v/v). The drugs were freshly prepared each time and intraperitoneally injected in a volume of 10 ml/kg body weight and were evaluated at the doses of 1, 3 or 10 mg/kg. The control animals received the same volume of vehicle (5% Tween 80 in saline). In order to determine the neuropharmacological profile of the EV, the tests were carried out 30 min after extract administration.

Animals

Swiss adult male CF1 mice (60 - 90 days of age and mean body weight of 36.18 ± 3.41 g) obtained from the FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, Brazil) were used for pharmacological assays. Each group consisted of 8, 9 or 10 animals. Animals were maintained on a 12h light/dark cycle with food and water available *ad libitum*. Behavioral procedures were conducted between 12:00a.m. and 5:30p.m. All experimental procedures were in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 85-23 revised 1996) and the procedures of the Brazilian College of Laboratory Animals (COBEA).

Behavioral testing

The same animals were used in 3 different behavioral tests. They were submitted first to open field exploration (Roesler *et al.*, 1999); 2 week after the end of the open field, they were tested in an inhibitory avoidance task. Finally, a novel object recognition task carried out 2 weeks after the end of the object recognition task. Between trials, the apparatus were washed with 70% ethanol solution.

Open Field Behavior

Open field exploration was carried out as previously described (Roesler *et al.*, 1999). The open field was a 50×25cm arena, surrounded by 50cm high walls, and made of brown plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. 30min after EV administration, mice were put in the apparatus, placed on its left rear quadrant, and left to freely explore the arena for 5 min. Latency to start locomotion, crossings of the black lines, rearings performed, and the number of fecal pellets were counted. The number of crossings and rearings was used respectively as measures of locomotor activity and exploratory behavior, whereas the latency to start locomotion and the number of

fecal pellets were used as measures of anxiety (Roesler *et al.*, 1999; Fernandez-Teruel *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 2004).

Inhibitory avoidance

Inhibitory avoidance in rodents is a widely used animal model of aversively motivated learning and memory (Izquierdo & Medina, 1997; Mcgaugh, 2000). The step-down inhibitory avoidance apparatus and procedures were described in a previous study (Roesler *et al.*, 1999). The inhibitory avoidance training box was a 50×25×25cm acrylic box whose floor consisted of parallel stainless steel bars (1mm diameter) spaced 1cm apart. A 100cm² wide, 2cm high platform was placed on the center of the floor. 30min after EV administration, animals were placed on the platform, and their latency to step-down on the grid with all 4 paws was recorded. In the training trial, immediately after stepping down on the grid, animals were given a 0.6mA/3s footshock. In retention test session carried out 24h (long-term memory retention) after training, no footshocks were given when step-down on the grid and a ceiling of 180s was imposed in the test latency.

Novel object recognition

The novel object recognition task was performed as previously described (Rosa *et al.*, 2003). Habituation in the object recognition task took place in the same arena used for the open field. Twenty-four hours after arena exploration, and 30min after EV administration, training was conducted by placing individual mice for 5min into the arena, in which 2 identical objects (objects A1 and A2; Duplo Lego toys) were positioned in 2 adjacent corners, 10cm from the walls. In a long-term memory retention test given 24h after training, the same mice explored the field for 5min in the presence of familiar object A1 and a novel object B. Between trials the objects were washed with 70% ethanol solution. All objects presented similar textures and sizes, but distinctive colors and shapes. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. The exploratory preference was defined as the percentage of the total exploration time that the animal spent investigating object A2 (in the training trial) or the novel object. Differences in exploratory preferences between training and retention test trials were used as memory retention scores.

Statistic analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Comparisons between groups were performed using One-way ANOVA, following LSD or Dunnett C. All statistical analyses were

performed using the statistical software package SPSS. In all comparisons, P values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results

Open field behavior

Results for open field behavior are shown in Fig. 1. There were no significant differences between groups in the latency to start locomotion ($P=0.09$; Fig. 1a), or defecation ($P=1.95$; Fig. 1b) indicating that EV showed no alterations in anxiety. However, mice treated with 10 mg/kg of EV showed a significantly lower number of crossings performed ($P=0.046$; Fig. 1c) and number of rearings ($P=0.039$; Fig. 1d), which indicates alterations in locomotion and reduced exploratory behavior, compared to control animals.

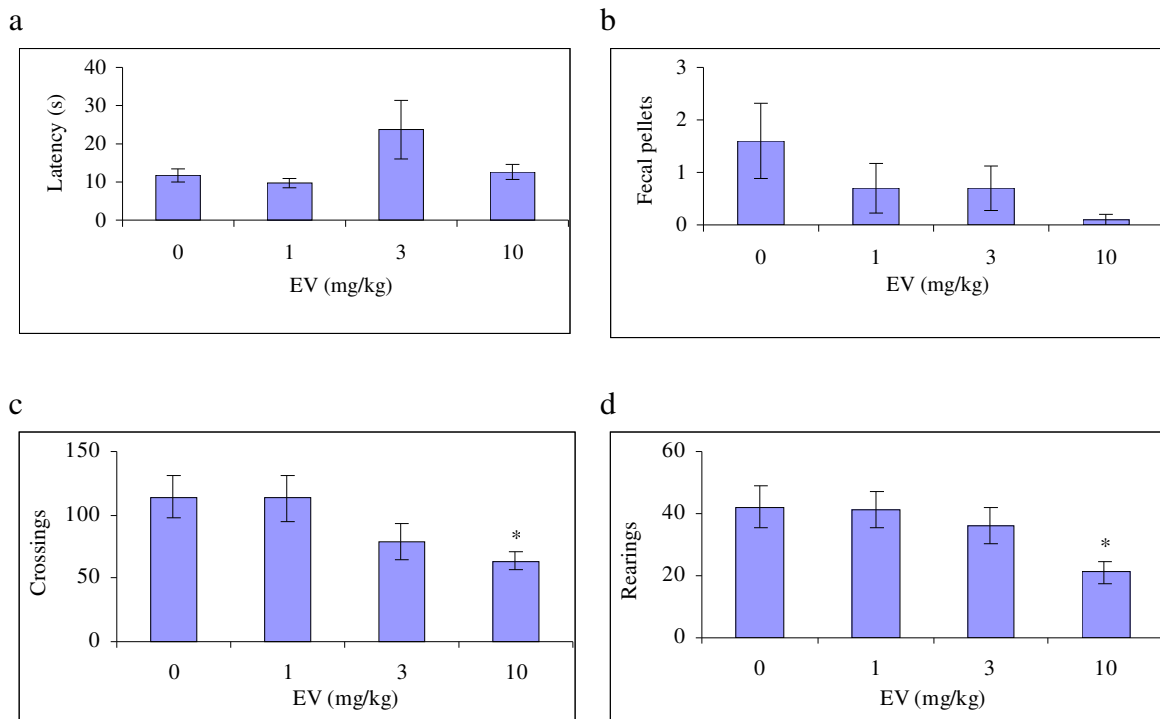
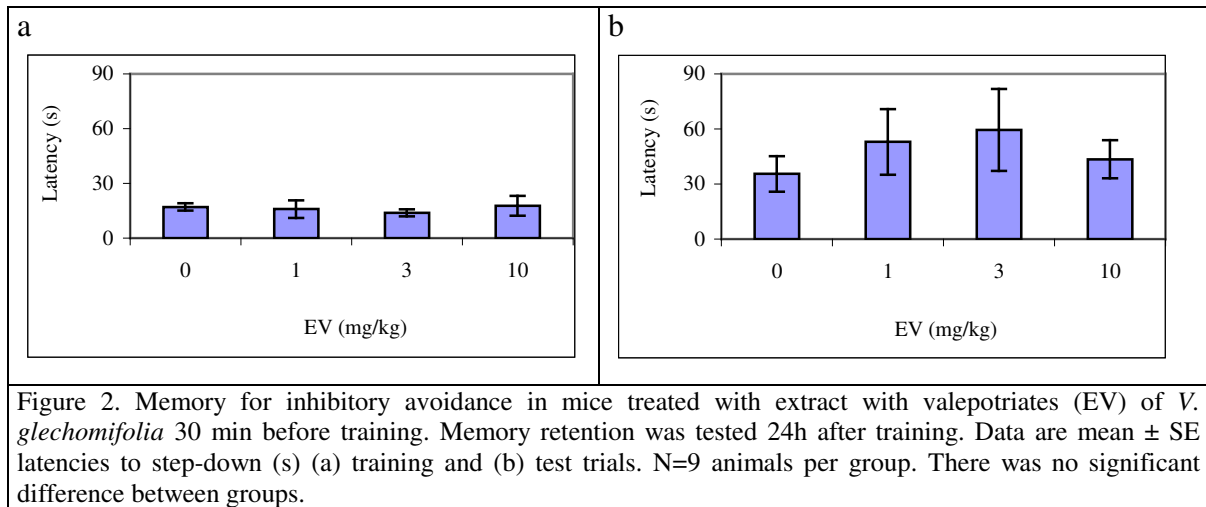


Figure 1. Open field behavior 30 min after administration of extract with valepotriates (EV) of *V. glechomifolia* in mice. Animals were left to freely explore the arena for 5min. Data are mean \pm SE (a) latency to start locomotion (seconds), (b) number of fecal pellets, (c) number of crossings and (d) number of rearings. $N=10$ animals in each group. *Significant difference from the control group ($P < 0.05$).

Inhibitory avoidance

Results for inhibitory avoidance are shown in Fig. 2. There were no significant differences between groups in step-down latencies in the training trial performances ($P=0.9$, mean \pm SE overall training trial step-down latencies was 16.2 ± 1.7 s; Fig. 2a). In addition, there was no significant difference between groups in long-term memory retention when compared

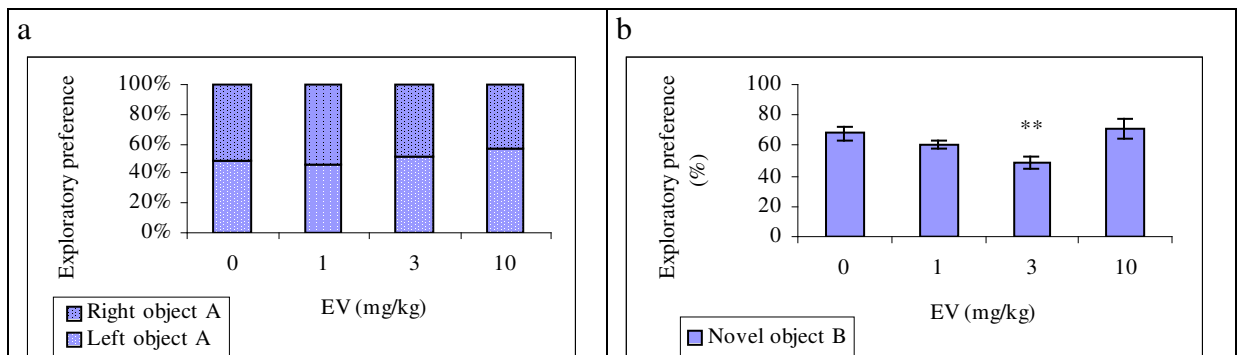
to the control group (Fig. 2b). These results indicate that EV did not induce any impairment in the inhibitory avoidance memory test.



Novel object recognition

In the recognition memory task, there was no difference between groups in the total time spent exploring both objects during the training trial, indicating that both groups showed similar motivation during task acquisition. Mean \pm SE total exploration time (s) was 80.9 ± 7.2 (control), 87.4 ± 7.9 (1), 63.3 ± 7.8 (3), and 70.6 ± 11.2 (10) mg/kg doses.

In addition, there was no significant difference between groups in exploratory preference in the training trial (Fig. 3a). There was significant difference from the control group at 3 mg/kg in long-term memory retention of the novel object recognition task ($P=0.01$; Fig. 3b). Others groups showed significant preference towards the novel object during the long-term retention test trials. These findings indicate that dose 3 mg/kg showed alterations in novel object recognition memory.



Discussion

Valeriana officinalis has been widely used in traditional medicine for its sedative, hypnotic and anticonvulsant effects. The roots of *V. officinalis* contain several compounds. These include the essential oil and its sesquiterpenoids (valerenic acid), epoxy iridoid esters (valepotriates) and their decomposition products (such as baldrinal and homobaldrinal), amino acids (arginine, GABA, glutamine, tyrosine), and alkaloids. Valerian also possesses small amounts of phenolic acids and flavonoids, valerosidatum, chlorogenic acid, caffeic acid, choline, β -sitosterol, fatty acids, and various minerals (Herbalist, 1999).

Studies in humans showed that valerian alone did not cause any somnolence the next morning; the benzodiazepines did result in a significant increase in reports of feeling more sleepy than usual the next morning (Block *et al.*, 2004). And unlike benzodiazepines, valerian appears to cause no impairments in driving abilities (Gerhard *et al.*, 1996).

At low doses of dichloromethane extracts of valerian does not appear to have any significant cytotoxicity or genotoxicity in human endothelial cell line ECV304, but, at high doses, causes moderate DNA damage through oxidative stress (Hui-Lian *et al.*, 2003). Only a few, minor, adverse events have been reported (Bos *et al.*, 1997). There has been a reported case of deliberate overdose by a suicidal patient, who came to no harm in consequence, leading the authors to comment: 'a valerian overdose equal approximately to 20 times the recommended therapeutic dose appears to be benign' (Willey *et al.*, 1995).

An influence of valerenic acid in rotarod and traction test was obtained only at relatively high doses (100 mg/kg or more), had an unspecific central nervous depressant activity (Hendriks *et al.*, 1985).

Marder *et al* (2003) detected activity on the CNS of two flavonoids isolated from *Valeriana wallichii*. A dose of 4 mg/kg of hesperidin decreased the ambulatory locomotor activity reduced the exploration of holes and the number of rearings performed in the holeboard test and increased the sodium thiopental-induced sleeping time. 6-methylapigenin at dose of 1 mg/kg produced anxiolytic-like effects and 10 mg/kg was devoid of sedative action evaluated in the holeboard test. The calculated percentage of 6-methylapigenin in the crude drug is in the range 0.013% to 0.0013% (Wasowski *et al.*, 2002), a low concentration.

Although the role of valepotriates is considered somewhat controversial, in this study, the extract contains 96% of valepotriates of *V. glechomifolia* was effective in the reduced locomotion during exploration and reduced exploratory behavior, in open field at 10 mg/kg mice, compared to control animals, indicating sedative propriety. Similar use for effects on

sleep, in popular medicine, interest in other valerian species. The EV showed no alterations in anxiety.

Our results show that, all groups performed normally the novel object recognition memory task except for the 3 mg/kg dose showed impaired long-term memory. The results indicate that mice treated with valepotriates presented no deficits in long-term memory for inhibitory avoidance, a type of single-trial aversively motivated conditioning, and impaired in novel object recognition memory task only at 3 mg/kg.

In summary, our results show sedative properties in extract with valepotriates of *V. glechomifolia* at 10 mg/kg, without impaired memory.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian agencies CAPES, CNPq, FAPERGS and PROPESQ-UFRGS.

References

- Andreatini, R.; Leite, J. R. Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal. *Eur J Pharmacol*, 260: 233-235, 1994.
- Bach, K. K.; Ghia, F.; Torssell, K. B. G. Valtrates and lignans in *Valeriana microphylla*. *Planta Med*, 59: 478-479, 1993.
- Backlund, A.; Moritz, T. Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. *Biochem Syst Ecol*, 26: 309-335, 1998.
- Block, K. I.; Gyllenhaal, C.; Mead, M. N. Safety and Efficacy of Herbal Sedatives in Cancer. *Care Integr cancer ther*, 3: 128-148, 2004.
- Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; de Smet, P. A. G. M.; Scheffer, J. J. C. In: de Smet, P. A. G. M.; Keller, K.; Hansel, R. & Chandler, R. F. (eds), *Adverse Effects Herbal Drugs*. Springer-Verlag, Berlin, vol. 3, 1997.
- Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; Van Putte, P. M. S.; Hendriks, H.; Scheffer, J. J. C. Seasonal variations of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Med*, 64: 143-147, 1998.
- Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; Pras, N. Determination of valepotriates. *J Chromatogr A*, 967: 131-146, 2002.
- Buchbauer, G.; Jager, W.; Jirovetz, L.; Meyer, F.; Dietrich, H. Effects of valerian root oil, borneol, isoborneol, bornyl acetate and isobornyl acetate on the motility of laboratory animals (mice) after inhalation. *Pharmazie*, 47: 620-622, 1992.
- Carlini, E. A. Plants and the central nervous system. *Pharmacol Biochem Beh*, 75: 501-512, 2003.

- Carvalho, C. M. B.; Maurmann, N.; Luz, D. I.; Fett-Neto, A. G.; Rech, S. B. Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Rep*, 23: 251-255, 2004.
- Cass, H. Herbs for the nervous system: ginkgo, kava, valerian, passionflower. *Semin Integr Med*, 2: 82-88, 2004.
- Dietz, B. M.; Mahady, G. B.; Pauli, G. F.; Farnsworth, N. R. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a} receptor *in vitro*. *Mol Brain Res*, 138: 191-197, 2005.
- Fernandez-Teruel, A.; Escorihuela, R. M.; Gray, J. A.; Aguilar, R.; Gil, L.; Gimenez-Llort, L.; Tobena, A.; Bhomra, A.; Nicod, A.; Mott, R.; Driscoll, P.; Dawson, G. R.; Flint, J. A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Res*, 12: 618-626, 2002.
- Gao, X. Q.; Björk, L. Valerenic acid derivatives and valepotriates among individuals, varieties and species of *Valeriana*. *Fitoterapia*, 71: 19-24, 2000.
- Gerhard, U.; Linnenbrink, N.; Georghiadou, C.; Hobi, V. Vigilance-decreasing effects of 2 plant-derived sedatives. *Schweiz Rundsch Med*, 85: 473-481, 1996.
- Henderson, N. D.; Turri, M. G.; Defries, J. C.; Flint, J. QTL analysis of multiple behavioral measures of anxiety in mice. *Behav Genet*, 34: 267-293, 2004.
- Hendriks, H.; Bos, R.; Allersma, D. P.; Malingre, T. M.; Koster, A. S. Pharmacological screening of valeranal and some other components of essential oil of *Valeriana officinalis*. *Planta Med*, 42: 62-68, 1981.
- Hendriks, H.; Bos, R.; Woerdenbag, H.; Koster, A. S. Central nervous depressant activity of valerenic acid in the mouse. *Planta Med*, 1: 28-31, 1985.
- Herbalist, R. U. *American herbal pharmacopoeia and therapeutic compendium*. Valerian root-*Valeriana officinalis*- Analytical, quality control, and therapeutic monograph. Santa Cruz, CA, US, p. 1-26, 1999.
- Herrera-Arellano, A.; Villegas, G. L.; Uriostegui, M. L. C.; Alvarez, L.; Pineda, G. V.; Alvarez, A. Z.; Tortoriello, J. Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. *Planta Med*, 67: 695-699, 2001.
- Hiller, K. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L: Behavioral and anticonvulsant properties. *Phytother Res*, 10: 145-151, 1996.
- Hölzl, J. *The pharmacology and therapeutics of valeriana*. In: Houghton P. J., editor. *Valerian*. The Netherlands: Harwood. p. 55-75, 1997.
- Houghton, P. J. The scientific basis for the reputed activity of valerian. *J Pharm Pharmacol*, 51: 505-512, 1999.
- Hui-Lian, W.; Fang, Z. D.; Feng, L. Z.; Yang, L.; Rong, L. Q.; Zhen, W. Y. *In vitro* study on the genotoxicity of dichloromethane extracts of valerian (DEV) in human endothelial ECV304 cells and the effect of vitamins E and C in attenuating the DEV-induced DNA damages. *Toxicol Appl Pharm*, 188: 36-41, 2003.

- Izquierdo, I.; Medina, J. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, 68: 285-316, 1997.
- Leuschner, J.; Muller, J.; Rudmann, M. Characterization of the central nervous depressant activity of a commercially available valerian root extract. *Arznei-forschung*, 43: 638-641, 1993.
- Marder, M.; Viola, H.; Wasowski, C.; Fernández, S.; Medina, J. H.; Paladini, A. C. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Beh*, 75: 537-545, 2003.
- Maurmann, N.; Carvalho, C. M. B.; Silva, A. L.; Fett-Neto, A. G.; Von Poser, G. L.; Rech, S. B. Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol, Plant*, 42: 50-53, 2006.
- Mcgaugh, J. L. Memory-A century of consolidation. *Science*, 287: 248-251, 2000.
- Morazzoni, P.; Bombardelli, E. *Valeriana officinalis*: traditional use and recent evaluation of activity. *Fitoterapia*, 66: 99-112, 1995.
- Plushner, S. L. Valerian: *Valeriana officinalis*. *Am J Health-Syst Ph*, 57: 328-333, 2000.
- Roesler, R.; Walz, R.; Quevedo, J.; De Paris, F.; Zanata, S. M.; Graner, E.; Izquierdo, I.; Martins, V. R.; Brentani, R. R. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrPc. *Mol Brain Res*, 71: 349-353, 1999.
- Rosa, R. M.; Flores, D. G.; Appelt, H. R.; Braga, A. L.; Henriques, J. A.; Roesler, R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci Lett*, 341: 217-220, 2003.
- Russowski, D.; Maurmann, N.; Rech, S. B.; Fett-Neto, A. G. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell Tiss Org*, 86: 211-218, 2006.
- Sakamoto, T.; Mitani, Y.; Nakajima, K. Psychotropic effects of Japanese valerian root extract. *Chem Pharm Bull*, 40: 758-761, 1992.
- Salles, L. A.; Silva, A. L.; Rech, S. B.; Zanatta, N.; Von Poser, G. L. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochem Syst Ecol*, 28: 907-910, 2000.
- Salles, L. A.; Silva, A. L.; Fett-Neto, A. G.; Von Poser, G. L.; Rech, S. B. *Valeriana glechomifolia*: *in vitro* propagation and production of valepotriates *Plant Sci*, 163: 165-168, 2002.
- Silva, A. L.; Rech, S. B.; Von Poser, G. L. Quantitative determination of valepotriates from valeriana native to south Brazil. *Planta Med*, 68: 570-572, 2002.
- Sobral, M. Valerianaceae. In: Flora ilustrada do Rio Grande do Sul. *Boletim do Instituto de Biociências*, UFRGS. 58: 1-61, 1999.
- Stevinson, C.; Ernst, E. Valerian for insomnia: a systematic review of randomized clinical trials. *Sleep Med*, 1: 91-99, 2000.
- Trease, G. E.; Evans, W. C. *Farmacognosia*. México: Editorial Continental: 687-690, 1984.

Veith, J.; Schneider, G.; Lemmer, B.; Willems, M. The effect of degradation products of valepotriates on the motor activity of light-dark synchronized mice. *Planta Med*, 52: 179-183, 1986.

Voneickstedt, K. W. Modification of the alcohol effect by valepotriate. *Arznei-forschung*, 19: 995-997, 1969.

Wagner, H. Comparative studies on the sedative action of valeriana extracts, valepotriates and their degradation products. *Planta Med*, 39: 358-365, 1980.

Wasowski, C.; Marder, M.; Viola, H.; Medina, J. H.; Paladini, A. C. Isolation and identification of 6-methylapigenin, a competitive ligand for the brain GABA(A) receptors, from *Valeriana wallichii*. *Planta Med*, 68: 934- 936: 2002.

Willey, L. B.; Mady, S. P.; Cobauth, D. T.; Wax, P. M. Valerian overdose: a case report. *Vet Hum Toxicol*, 37: 2137-2145, 1995.

V. Discussão

O cultivo *in vitro* de *Valeriana glechomifolia* Meyer foi estabelecido por Salles *et al.* (2002). A espécie apresenta interesse, uma vez que possui valepotriatos nas partes aéreas e subterrâneas (Silva *et al.*, 2002) – compostos relacionados a atividades fungicidas, anti-tumorais, ansiolíticas e sedativas (Fuzzati *et al.*, 1996; Bergman & Cott, 1999; Dewick, 2000). É uma espécie nativa dos Campos de Cima da Serra (Sobral, 1999a) e encontra-se em processo de extinção (IBAMA n.º 37-N, 1992).

Neste trabalho foram realizados experimentos de avaliação da propagação *in vitro* de plântulas de *V. glechomifolia* submetidas a longo prazo de cultivo, e variando concentrações de nutrientes do meio de cultura Murashige & Skoog (1962) semi-sólido, para avaliação dos efeitos no crescimento e na produção de valepotriatos, bem como a relação entre esses dois parâmetros.

A micropropagação geralmente envolve transferência periódica do material vegetal para novos meios, após 1 a 2 meses, devido à exaustão de nutrientes no meio e também ao contínuo crescimento e propagação dos tecidos, os quais são geralmente limitados pelo tamanho do recipiente de cultura (Etienne & Berthouly, 2002). Como *V. glechomifolia* é uma planta de pequeno porte e possivelmente não há muitas exigências nutricionais para seu crescimento, as culturas puderam ser mantidas no mesmo frasco por nove meses, sem subcultura para novos meios de cultura. Por volta do nono mês, os meios de cultura apresentaram-se exauridos e as plantas mostraram sinais de senescência (clorose e necrose foliar).

Os meios de cultura estudados demonstraram-se viáveis para o desenvolvimento de plântulas de *V. glechomifolia*, proporcionando aumento da biomassa e manutenção da biossíntese de valepotriatos. As plântulas cultivadas em meio MS apresentaram o maior índice de crescimento durante todo o período de estudo, bem como maior número de folhas e maior biomassa. A maior concentração de sais parece ativar o metabolismo primário da planta, estimulando o crescimento. Tais resultados indicam o meio MS como o mais adequado para utilização em experimentos que necessitem de maior biomassa em curto período de tempo, uma vez que propicia maior crescimento, com maior velocidade de

obtenção de material vegetal em relação aos demais meios estudados.

Plantas cultivadas em M Δ mostraram os maiores teores de valepotriatos principalmente a partir do quinto mês de cultivo. A principal modificação na composição do M Δ incluiu o maior teor de inositol e dos microelementos Cu, Mo, I e Co em sua formulação. As possíveis razões para o efeito estimulatório desses componentes na produção de valepotriatos incluem o efeito do inositol no metabolismo de auxinas e na sinalização celular, bem como o potencial de estresse oxidativo de baixa intensidade induzido pelos microelementos.

A quantificação dos valepotriatos produzidos pelas plantas cultivadas nos três meios analisados demonstrou pouca variação do primeiro ao quarto mês. No quinto mês de cultivo foi observada uma tendência de aumento, seguida de platô, podendo ser detectada a maior produção em 6 meses, a qual se mantém até o oitavo mês de cultivo, quando então diminui. Esse acúmulo de valepotriatos parece seguir uma cinética clássica de produção, com aumento, estagnação e declínio, possivelmente decorrente do esgotamento de nutrientes no meio de cultura, resultando na diminuição da produção de metabólitos. A tendência geral observada é de ocorrer produção de valepotriatos vinculada ao crescimento vegetal.

Plântulas de *V. glechomifolia* cultivadas em meio líquido MS completo apresentaram maior crescimento que plantas cultivadas em diluições do meio líquido MS (0,1 ou 0,3x). A maior biomassa dessas plantas foi também acompanhada de maiores teores de valepotriatos (Russowski *et al.*, 2006).

V. glechomifolia in natura produz cerca de 2g% de valepotriatos, calculados em relação à massa seca (Salles *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002). Esse valor é cerca de 5 vezes menor do que o de plântulas mantidas em meio M Δ *in vitro* por seis meses. Outra diferença é em relação à proporção de valepotriatos. Em folhas de plantas *in natura*, ACE é o valepotriato preponderante, seguido pelo VAL e DII (Salles *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002). As culturas de plantas mantidas nos três tratamentos estudados apresentaram maior acúmulo de diidrovaltrato, seguido pelo valtrato, sendo o acevaltrato minoritário. A resposta do metabolismo de valepotriatos em modificações no meio de cultura provavelmente envolve efeitos relacionados ao metabolismo parcialmente heterotrófico no cultivo *in vitro*.

Foi quantificada a produção de ACE e isovaltrato em 117 espécies e variedades de

valeriana e culturas micropropagadas de *V. officinalis*. A média de produção das espécies foi de $0,06 \pm 0,04\text{g}\%$ de valepotriatos (PS). As plântulas micropropagadas obtidas a partir das linhas Nos. 250 e 281 produziram $0,03 \pm 0,01$ e $0,28 \pm 0,06\text{g}\%$, respectivamente, e as plantas regeneradas desse cultivo *in vitro* produziram um máximo de $0,52\text{g}\%$, com a vantagem de menores variações no conteúdo dos compostos de interesse (Gao & Björk, 2000).

Um estudo comparando os níveis de valepotriatos de culturas *in vitro* e plantas regeneradas de *V. edulis* spp. *procera* demonstrou que os maiores teores de produção de valepotriatos ocorreram em rizomas ($0,19\text{g}\%$ PS de VAL) e raízes ($0,21\text{g}\%$ PS de DII) de plantas regeneradas, sendo essa concentração semelhante à encontrada em plantas selvagens de *V. edulis* no estágio reprodutivo (Castillo *et al.*, 2002). *V. mexicana* produz cerca de $2,9\text{g}\%$ VAL/isovaltrato e $2,5\text{g}\%$ de DII (Tittel & Wagner, 1978); raízes e rizomas de *V. officinalis* produzem entre $1,1-1,4\text{g}\%$ (PS) de valepotriatos (Bos *et al.*, 1998) e partes subterrâneas de *V. wallichii* produzem $0,09-1,30\text{g}\%$ de PS de valepotriatos (Bos *et al.*, 1997).

Comparando-se os dados bibliográficos de quantificações de valepotriatos em espécies de valeriana (cultivadas ou a campo), conclui-se que plântulas de *V. glechomifolia* obtidas após seis meses de cultivo em meio M Δ mostram-se altamente produtivas para valepotriatos (mais de $10\text{g}\%$ PS). Esse longo tempo de cultivo é interessante para manutenção de culturas estoque, com redução de repiques, insumos de cultivo e espaço para incubação.

Foram elucidados mais de 150 constituintes químicos em espécies de valeriana, sendo muitos fisiologicamente ativos. Os grupos majoritários de compostos presentes em espécies são os mono- e sesquiterpenóides (Gao & Björk, 2000). Acredita-se que ambas as classes apresentem atividade sedativa, porém o mecanismo de ação das mesmas ainda não foi completamente estabelecido (Houghton, 1999; Tesch, 2001; Cass, 2004). A Farmacopéia Européia requer a presença detectável de valepotriatos e de ácidos valerênicos (Gao & Björk, 2000). Já a Farmacopéia Brasileira prevê a padronização em relação aos ácidos valerênicos (Farmacopéia Brasileira, 1988).

Valepotriatos têm sido considerados importantes para ações biológicas, e vários estudos apontaram para o efeito farmacológico desses compostos, mas são relatadas controvérsias devido à sua baixa estabilidade em soluções. Entretanto, os valepotriatos diênicos mostraram-se relativamente estáveis em metanol anidro, estocado a 20°C (Bos *et al.*, 2002). O homobaldrinal, um produto de degradação de valepotriatos, demonstrou maior efeito

em dose oral, podendo agir como pró-droga (Morazzoni & Bombardelli, 1995; Houghton, 1999). Valepotriatos também demonstraram citotoxicidade, podendo atuar como agentes antitumorais (Bounthanh *et al.*, 1981).

Constituintes dos óleos essenciais de valeriana parecem inibir o catabolismo do GABA, levando à sedação (Hendriks *et al.*, 1981; ESCOP, 1997). Riedel *et al.* (1982) mostraram que o ácido valerênico inibiu o catabolismo do GABA no cérebro de roedores. Extratos hidroalcoólicos e aquosos de valeriana demonstraram afinidades por receptores GABA_A (Mennini *et al.*, 1993), e também parecem interagir com outros componentes pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos (Santos *et al.*, 1994a; Ortiz *et al.*, 1999). Frações lipofílicas do extrato alcoólico e DII mostraram afinidade por receptores barbitúricos e por receptores benzodiazepínicos periféricos (Mennini *et al.*, 1993). Holz & Godau (1989) também demonstraram que componentes de extratos de valeriana ligam-se a receptores benzodiazepínicos *in vitro*. A presença do aminoácido GABA em extratos aquosos de raízes sugerem envolvimento no poder sedativo de valeriana (Santos *et al.*, 1994b).

Diversos estudos clínicos indicam eficácia de valeriana, diminuindo a latência para adormecer e melhorando a qualidade do sono. A utilização da planta demonstra nos pacientes um perfil favorável em relação aos efeitos colaterais, sem as implicações residuais de fadiga, sonolência, amnésia, redução do tônus muscular na manhã seguinte, tolerância, dependência ou síndrome de abstinência (Vorbach *et al.*, 1966; Leathwood *et al.*, 1982; Leathwood & Chauffard, 1982-83; Lindahl & Lindwall, 1989; Gerhard *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 2000; Donath *et al.*, 2000; Dorn, 2000; Herrera-Arellano *et al.*, 2001; Poyares *et al.*, 2002).

Devido às controvérsias existentes na literatura em relação ao papel dos valepotriatos, também objetivamos demonstrar efeitos biológicos do extrato de *V. glechomifolia* contendo valepotriatos. Embora a classe de compostos estudada seja a mesma, as proporções entre os valepotriatos majoritários são diferentes entre *V. glechomifolia* e as demais espécies utilizadas na medicina, como *V. officinalis*. O estudo de caracterização de outras estruturas químicas presentes em *V. glechomifolia*, bem como em outras espécies de valeriana nativas do Rio Grande do Sul está sendo realizado pela doutoranda Luisa A. Salles do PPGCF/UFRGS, sob orientação da Prof. Doutora Gilsane Lino von Poser.

Entre as prováveis substâncias ativas encontradas em valeriana, foram isoladas, de *V. wallichii* e de *V. officinalis*, e testadas: a 6-metilapigenina, uma flavona que demonstrou efeito

ansiolítico na dose de 1 mg/kg e efeito sedativo na dose de 10 mg/kg; a hesperidina, uma flavanona glicosídica que na dose de 4 mg/kg demonstrou propriedades sedativas (Marder *et al.*, 2003); e a linarina, uma flavona glicosídica, de propriedades sedativas semelhantes as da hesperidina (Fernández *et al.*, 2004). Os teores encontrados de 6-metilapigenina são de 0,013 a 0,0013% (PS) (Wasowski *et al.*, 2002).

Em espécies utilizadas comercialmente, como *V. officinalis*, os valepotriatos estão presentes nas concentrações de 1,1-1,4% (PS) nas raízes (Bos *et al.*, 1997). Os ácidos valerênicos, que são de 3 a 8 vezes mais concentrados que valepotriatos em espécies de valeriana (Gao & Björk, 2000), mostraram-se ativos em camundongos na dose de 100 mg/kg ou mais, nos testes de tração e *rotarod*, demonstrando atividade depressiva não específica do sistema nervoso (Hendriks *et al.*, 1985).

Entre as doses do extrato clorofórmico semi-purificado (contendo 96% de VAL, ACE e DII, quantificados por CLAE) estudadas neste trabalho, a dose de 10 mg/kg, injetada intraperitonealmente em camundongos, apresentou diferença estatística significativa do grupo controle nas medições de locomoção (número de cruzamentos) e de comportamento exploratório (número de *rearings*) no campo aberto, indicando possível efeito hipnótico/sedativo. Nessa dose, não foi afetada a memória nos testes de esQUIVA INIBITÓRIA e reconhecimento de objeto, ambos realizados com injeções pré-treino do extrato.

Nas doses do extrato testadas, não foram observadas diferenças significativas na ansiedade – avaliada pela latência e número de bolos fecais – no experimento de campo aberto. Porém, esses parâmetros analisados não têm muita especificidade, e o efeito do EV será testado no labirinto em cruz-elevado.

Uma curva característica de memória foi obtida no experimento de reconhecimento de objeto de longa duração (após 24 horas), em que a dose de 3 mg/kg do EV prejudicou a memória de reconhecimento do novo objeto, quando os animais receberam injeção do extrato pré-treino. Essa dose também demonstrou aumento na latência no campo aberto, mas não ocorreram diferenças estatísticas (com $P= 0,089$) em relação à significância estipulada de $P= 0,05$. Nas demais doses testadas, não foram observados prejuízos na memória de reconhecimento de objeto de longa duração (tarefa de aprendizado simples, uma memória dos animais correspondente à memória declarativa de fatos e episódios em humanos) e esQUIVA INIBITÓRIA (uma memória aversiva emocional), avaliadas após 24 horas.

Em suma, os resultados mostram que o cultivo *in vitro* representa um sistema adequado para produção sustentada e renovável de biomassa cataliticamente ativa de *V. glechomifolia* para produção de valepotriatos. As modificações de nutrientes no meio de cultivo parecem ser uma forma promissora de modular a produção de valepotriatos. O extrato de valepotriatos da espécie em tela possui efeito sedativo sem prejuízo à memória em modelo animal. Futuros estudos avaliarão efeitos ansiolíticos de valepotriatos e o papel desses metabólitos no estresse oxidativo em camundongos.

VI. Obras consultadas

- Andreatini, R.; Leite, J. R. Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal. *Eur J Pharmacol*, 260: 233-235, 1994.
- Andreatini, R.; Boerngen-Lacerda, R.; Zorzetto Filho, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. *Rev Bras Psiquiatr*, 23: 233-242, 2001.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 15 de setembro de 2006.
- Attele, A. S.; Xie, J. T.; Yuan, C. S. Treatment of insomnia: an alternative approach. *Altern Med Rev*, 5: 249-259, 2000.
- Auchewski, L.; Andreatini, R.; Galduróz, J.; Lacerda, R. Avaliação da orientação médica sobre os efeitos colaterais de benzodiazepínicos. *Rev Bras Psiquiatr*, 26: 24-31, 2004.
- Bach, K. K.; Ghia, F.; Torrsell, K. B. G. Valtrates and lignans in *Valeriana microphylla*. *Planta Med*, 59: 478-479, 1993.
- Backlund, A.; Moritz, T. Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. *Biochem Syst Ecol*, 26: 309-335, 1998.
- Balderer, G.; Borbély, A. A. Effect of valerian on human sleep. *Psychopharmacology*, 87: 406-409, 1985.
- Banerjee, S.; Rahman, L.; Uniyal, G.C.; Ahuja, P.S. Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy roots cultures of *Valeriana wallichii* DC. *Plant Sci*, 131: 203-208, 1998.
- Barnes, P. M.; Powell-Griner, E.; McFann, K.; Nahin, R. L. Complementary and alternative medicine use among adults: United States, 2002. *Adv Data*, 1-19, 2004.
- Beaubrun, G.; Gray, G. E. A Review of herbal medicines for psychiatric disorders. *Psych Serv*, 51: 1130-1134, 2000.
- Becker, H.; Schrall, R. Valepotriates in tissue cultures of nine different Valerianaceae species in comparison to literature data of the intact plants. *J Nat Prod*, 43: 721-723, 1980.
- Becker, H.; Chavadej, S.; Weberling, F. Valepotriates in *Valeriana thalictroides*. *Planta Med*, 49: 64-64, 1983.
- Bell, C. D.; Donoghue, M. J. Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Organ Divers Evol*, 5: 147-159, 2005.
- Berman, A. F.; Cott, J. M. Dietary supplements and natural products as psychotherapeutic. *Ag Psych Med*, 61: 712-728, 1999.
- Block, K. I.; Gyllenhaal, C.; Mead, M. N. Safety and efficacy of herbal sedatives in cancer. *Care integr cancer ther*, 3: 128-148, 2004.

- Blumenthal, M.; Gruenwald, J.; Hall, T. et al (eds): *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Boston, MA, Integrative Medicine Communications, 2000.
- Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; Hendriks, H.; Zwaving, J. H.; De Smet, P.A.G.M.; Tittel, G.; Wikstrom, H. V.; Scheffer, J. J. C. Analytical aspects of phytotherapeutic valerian preparations. *Phytochem Anal*, 7: 143-143, 1996.
- Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; De Smet, P. A. G. M.; Scheffer, J. J. C. In: De Smet, P. A. G. M.; Keller, K.; Hansel, R.; Chandler, R. F. (eds), *Adverse Effects of Herbal Drugs*. Springer-Verlag, Berlin, vol. 3, 1997.
- Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; Van Putte, P. M. S.; Hendriks, H.; Scheffer, J. J. C. Seasonal variations of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Med*, 64: 143-147, 1998.
- Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; Pras, N. Determination of valepotriates. *J of Chromatogr A*, 967: 131-146, 2002.
- Bounthan, C.; Bergmann, L.; Beck, J.; Haag-Berruier, M.; Anton, R. Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Med*, 41: 21-28, 1981.
- Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S.; Gontier, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Scie*, 161: 839-851, 2001.
- Brummitt, R. K. *Vascular plant families and genera*. London, Royal Botanic Gardens-Kew, 1992.
- Buchbauer, G.; Jager, W.; Jirovetz, L.; Meyer, F.; Dietrich, H. Effects of valerian root oil, borneol, isoborneol, bornyl acetate and isobornyl acetate on the motility of laboratory animals (mice) after inhalation. *Pharmazie*, 47: 620-622, 1992.
- Caldas, L. S.; Haridasan, P.; Ferreira, M. E. Meios Nutritivos. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (eds): *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. 1ª Edição. Brasília: Embrapa. Vol. 1, p. 87-132, 1998.
- Carvalho, C. M. B. Otimização da micropropagação e estabelecimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia* Meyer. Dissertação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- Carvalho, C. M. B.; Maurmann, N.; Luz, D. I.; Fett-Neto, A. G.; Rech, S. B. Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Rep*, 23: 251-255, 2004.
- Cass, H. Herbs for the Nervous System: Ginkgo, Kava, Valerian, Passionflower. *Semin Integr Med*, 2: 82-88, 2004.
- Castillo, P.; Márquez, J.; Rubluo, A.; Hernández, G.; Lara, M. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Sci*, 151: 115-119, 2000.
- Castillo, P.; Zamilpa, A.; Márquez, J.; Hernández, G.; Lara, M.; Alvarez, L. Comparative study of differentiation levels and valepotriate content of *in vitro* cultures and regenerated and wild plants of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. *J Nat Prod*, 65: 573-575, 2002.

Cerny, A.; Schmid, K. Tolerability and efficacy of valerian/lemon balm in healthy volunteers (a double-blind, placebo-controlled, multicentre study). *Fitoterapia*, 70: 221-228, 1999.

Choi, H. K.; Kim, S. I.; Son, J. S.; Hong, S. S.; Lee, H. S.; Lee, H. J. Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27; 593-598, 2000.

Corrado, T. (ed.): *Bioactive compounds from natural sources. Isolation, characterization and biological properties*. London: Taylor; Francis, p. 3, 2001.

Costa, L. G.; Steardo, L.; Cuomo, V. Structural effects and neurofunctional sequelae of developmental exposure to psychotherapeutic drugs: experimental and clinical aspects. *Pharmacol Rev*, 56: 103-147, 2004.

Dahlgren, G. The last Dahlgrenogram, System of classification of the dicotyledons. In: Tan. K. (ed.): *Plant Taxonomy, Phytogeography and Related Subjects*. Edinburgh: Edinburgh Univ. Press, 1989.

DEF. *Dicionário de Especialidades Farmacêuticas*. 34^a Edição. Editora de Publicações Biomédicas (ed.), 2005/06.

Denee, R.; Bos, R.; Hazelhoff, B. Isolation and structure elucidation of isovaltral, a decomposition product of isovaltrate. *Planta Med*, 37: 45-48, 1979.

Dewick, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. London: Barnes & Noble. p. 520, 2000.

Dicosmo, F.; Misawa, M. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotech Advances*, 13: 425-435, 1995.

Dietz, B. M.; Mahady, G. B.; Pauli, G. F.; Farnsworth, N. R. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a} receptor *in vitro*. *Mol Brain Res*, 138: 191-197, 2005.

Dixon, R. A. Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 192-197, 1999.

Dominguez, R. A.; Bravo-Valverde, R. L.; Kaplowitz, B. R.; Cott, J. M. Valerian as a hypnotic for Hispanic patients. *Cultur Divers Ethnic Minor Psychol*, 6: 84-92, 2000.

Donath, F.; Quispe, S.; Diefenbach, K.; Maurer, A.; Fietze, I.; Roots, I. Critical evaluation of the effect of valerian extract on sleep structure and sleep quality. *Pharmacopsychiatry*, 33: 47-53, 2000.

Dorn, M. Efficacy and tolerability of Baldrian versus oxazepam in non-organic and non-psychiatric insomniacs: a randomised, double-blind, clinical, comparative study. *Forsch Kompl Kl Na*, 7: 79-84, 2000.

Dossaji, S. F.; Becker, H. HPLC separation and quantitative determination of valepotriates from *Valeriana kilimandascharica*. *Planta Med*, 43: 179-182, 1981.

Enciso-Rodríguez, R. Micropropagation of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. *Planta Med*, 63: 274-275, 1997.

ESCOP. *Monographs on the Medicinal Use of Plants*. Brussels: European Scientific Cooperative for Phytotherapy, Exeter UK, 1997.

- Etienne, H.; Berthouly, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Org*, 69: 215-231, 2002.
- Fakim, A. G. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1-93, 2006.
- FAO. *Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification*. Forest Genetic Resources Working Paper FGR/59E. Forest Resources Development Service, Forest Resources Division, Food and culture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 2004.
- Farmacopéia Brasileira, 1988-1996. 4ª Edição. São Paulo: Atheneu.
- Fernández, S.; Wasowski, C.; Paladini, A. C.; Marder, M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Beh*, 77: 399-404, 2004.
- Foerster, W.; Becker, H.; Rodriguez, E. HPLC analysis of valepotriates in the north american genera plecritis and valeriana. *Planta Med*, 50: 7-9, 1984.
- Fowler, M. W.; Cresswell, R. C.; Stafford, A. M. An economic and technical assessment of the use of plant cell cultures for natural product synthesis on an industrial scale. *Ciba Found Symp*, 154: 157-170, 1990.
- Francis, A. J. P.; Dempster, R. J. W. Effect of Valerian, *Valeriana edulis*, on sleep difficulties in children with intellectual deficits: randomised trial. *Phytomedicine*, 9: 273-279, 2002.
- Franck, B.; Petersen, U.; Huper, F. Valerianie, a tertiary monoterpene alkaloid from valerian (1). *Angew Chem Int Ed Engl*, 9: 891, 1970.
- Funke, E. D.; Friedrich, H. Valepotriates in the aerial parts of some more valerianaceae species. *Planta Med*, 28: 215-224, 1975.
- Fursa, N. S.; Litvinenko, V. I. Flavonoid content of the aboveground organs of *Valeriana coreana*. *Farmatsevtichnyi Zhurnal Kiev*, 3: 74-74, 1981.
- Fursa, N. S.; Belyaeva, L. E. Flavonoid composition of vegetative and reproductive organs of *Valeriana tuberosa* L. *Ukrainskyi Botanichnyi Zhurnal*, 10: 36-38, 1983.
- Fursa, N. S.; Gorovoi, P. G.; Ivanova, L. G. Flavonoid composition of the aerial organs of *Valeriana ajanensis* and *Valeriana fasciculata*. *Farmatsevtichnyi Zhurnal Kiev*, 6: 66-67, 1987.
- Fuzzati, N.; Wolfender, J. L.; Hostettmann, K.; Msonthi, J. D.; Mavi, S.; Molleyres, L. P. Isolation and antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the search for valepotriates in crude Valerianaceae extracts. *Phytochem Anal*, 7: 76-85, 1996.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells. *Expel Cell Research*, 50: 151-158, 1968.
- Gao, X. Q.; Björk, L. Valerenic acid derivatives and valepotriates among individuals, varieties and species of *Valeriana*. *Fitoterapia*, 71: 19-24, 2000.
- Gerhard, U.; Linnenbrink, N.; Georghiadou, C.; Hobi, V. Vigilance-decreasing effects of two plant-derived sedatives. *Schweiz Rundsch Med Prax*, 85: 473-481, 1996.

- Gilani, A. H.; Khan, A.; Jabeen, Q.; Subhan, F.; Ghafar, R. Antispasmodic and blood pressure lowering effects of *Valeriana wallichii* are mediated through K⁺ channel activation. *J Ethnopharmacol*, 100: 347-352, 2005.
- Gontier, E.; Clément, A.; Tran, T.L.M.; Gravot, A.; Lièvre, K.; Guckert, A.; Bourgaud, F. Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production. *Plant Sci*, 163: 723-732, 2002.
- Graeff, F. G.; Guimarães, F. S. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo: Editora Atheneu. p. 93-122, 2001.
- Gränicher, F.; Christen, P.; Kamalaprija, P.; Burger, U. An iridoid diester from *Valeriana officinalis* var. *Sambucifolia* hairy roots. *Phytochemistry*, 38: 103-105, 1995.
- Gruenwald, J. The supplement markets in the US and Europe. *Neutraceuticals World*, Jul/Aug: 36-37, 2000.
- Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. New York: Mc Graw Hill; 2001.
- Hazarika, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108: 105-120, 2006.
- Hazelhoff, B.; Malingre, T. M.; Meijer, D. K. Antispasmodic effects of valeriana compounds: an *in-vivo* and *in-vitro* study on the guinea-pig ileum. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 257: 274-287, 1982.
- Hendriks, H.; Bos, R.; Allersma, D. P.; Malingre, T. M.; Koster, A. S. Pharmacological screening of valeranal and some other components of essential oil of *Valeriana officinalis*. *Planta Med*, 42: 62-68, 1981.
- Hendriks, H.; Bos, R.; Woerdenbag, H.; Koster, A. S. Central nervous depressant activity of valerenic acid in the mouse. *Planta Med*, 1: 28-31, 1985.
- Herman, E. B. *Recent advances in plant tissue culture*. In "Secondary metabolite production", v. 2., p. 125, E. B. Herman (ed), 125 pp. Agritech Consultants, 1993.
- Herrera-Arellano, A.; Villegas, G. L.; Uriostegui, M. L. C.; Alvarez, L.; Pineda, G. V.; Alvarez, A. Z.; Tortoriello, J. Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. *Planta Med*, 67: 695-699, 2001.
- Hiller, K. O.; Zetler, G. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: behavioural and anticonvulsant properties. *Phytotherapy Res*, 10: 145-151, 1996.
- Hobbs, C. Valerian. *Herbalgram*, 21: 19-34, 1989.
- Holz, J.; Godau, P. Receptor binding studies with *Valeriana officinalis* on the benzodiazepine receptor. *Planta Med*, 55: 642, 1989.
- Hölzl, Von J.; Jurcic, K. Valepotriate in den Blättern von *Valeriana jatamansii*. *Planta Med*, 27: 133-139, 1975.
- Houghton, P. J. The biological activity of valerian and related plants. *J Ethnopharmacol*, 22: 121-142, 1988.

- Houghton, P. J. The scientific basis for the reputed activity of valerian. *J Pharm Pharmacol*, 51: 505-512, 1999.
- IBAMA. Portaria N° 37-N. *Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção*, 03 de abril de 1992.
- Janot, M. M.; Guilhem, J.; Contz, O.; Venera, G.; Cionga, E. Contribution to the study of valerian alkaloids (*Valeriana officinalis*, L.): actinidine and naphthyridylmethylketone, a new alkaloid. *Ann Pharm Fr*, 37: 413-420, 1979.
- Jeong, C. S.; Chakrabarty, D.; Hahn, E. J.; Lee, H. L.; Paek, K. Y. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Bioch Eng J*, 27: 252-263, 2006.
- Kapczinski, F.; Ribeiro, L. Ansiedade. In: Kapczinski, F.; Quevedo, J.; Izquierdo, I. (ed): *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos*. São Paulo: Artmed, p. 137-149, 2000.
- Kaur, R.; Sood, M.; Chander, S.; Mahajan, R.; Kumar, V.; Shama, D. R. *In vitro* propagation of *Valeriana jatamansi*. *Plant Cell Tiss Org*, 59: 227-229, 1999.
- Khan, I. A. Issues related to botanicals. *Life Sciences*, 78: 2033-2038, 2006.
- Koehn, F. E.; Carter, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 4: 206-220, 2005.
- Korolkovas, A. *Dicionário de Especialidades Farmacêuticas*. Ed. 1998/1999. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-10, 1999.
- Leathwood, P. D.; Chauffard, F.; Heck, E.; Munoz Box, R. Aqueous extract of valerian root (*Valeriana officinalis* L) improves sleep quality in man. *Pharmacol Biochem Beh*, 17: 65-71, 1982.
- Leathwood, P. D.; Chauffard, F. Quantifying the effects of mild sedatives. *J Psychiatr Res*, 17: 115-122, 1982-83.
- Leathwood, P. D.; Chauffard, F. Aqueous extract of valerian reduces latency to fall asleep in man. *Planta Med*, 51: 144-148, 1985.
- Léger, D.; Guilleminault, C.; Bader, G.; Lévy, E.; Paillard, M. Medical and socio-professional impact of insomnia. *Sleep*, 25: 621-625, 2002.
- Leuschner, J.; Muller, J.; Rudmann, M. Characterization of the central nervous depressant activity of a commercially available valerian root extract. *Arzneimittelforschung*, 43: 638-641, 1993.
- Lindahl, O.; Lindwall, L. Double blind study of a valerian preparation. *Pharmacol Biochem Beh*, 32: 1065-1066, 1989.
- Linsmaier, E. M.; Skoog, F. Organic growth factor requirements for tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18: 100-127, 1965.
- Longo, L. P.; Johnson, B. Addiction: Part. I. Benzodiazepines- side effects, abuse risk and alternatives. *Am Farm Physician*, 61: 2121-2128, 2000.
- Marder, M.; Viola, H.; Wasowski, C.; Fernández, S.; Medina, J. H.; Paladini, A. C. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Beh*, 75: 537-545, 2003.

- Mathur, J.; Ahuja, P.S. Plant regeneration from callus of *Valeriana wallichii*. *Plant Cell Rep*, 9: 523-525, 1991.
- Mathur, J. Plantelet regeneration from suspension cultures of *Valeriana wallichii* DC. *Plant Sci*, 81: 111-115, 1992.
- Maurmann, N.; Luz, D.; Carvalho, C. M. B.; Rech, S. B. Caracterização do crescimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 15: 2003.
- Maurmann, N.; Carvalho, C. M. B.; Silva, A. L.; Fett-Neto, A. G.; Von Poser, G. L.; Rech, S. B. Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol, Plant*, 42: 50-53, 2006.
- Mennini, T.; Bernasconi, P.; Bombardelli, E.; Morazzoni, P. *In vitro* study of the interaction of extracts and pure compounds from *Valeriana officinalis* roots with GABA, benzodiazepine and barbiturate receptors in rat brain. *Fitoterapia*, 54: 291-300, 1993.
- Milkova, E.; Atanasov, A.; Panaiotov, K.H. Some aspects of the initiation of callus and suspension cultures of *Valeriana officinalis* var. *Diliana*. *Acta Biotechnologica*, 8: 427-433, 1988.
- Misawa, M. Production of useful plants metabolites. In: Frichter, A. Ed. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag, v. 31, p. 59-88, 1985.
- Morazzoni, P.; Bombardelli, E. *Valeriana officinalis*: traditional use and recent evaluation of activity. *Fitoterapia*, 66: 99-112, 1995.
- Moul, D. E.; Nofzinger, E. A.; Pilkonis, P. A.; Houck, P. R.; Miewald, J. M. Buysse, D. J. Symptom reports in severe chronic insomnia. *Sleep*, 25: 553-563, 2002.
- Müller, C. E. A1 adenosine receptors and their ligands: overview and recent development. *Farmaco*, 56: 77-80, 2000.
- Müller, S. F.; Klement, S. A combination of valerian and lemon balm is effective in the treatment of restlessness and dyssomnia in children. *Phytomedicine*, 13: 383-387, 2006.
- Müller, D.; Pfeil, T.; Von Den Driesch, V. Treating depression comorbid with anxiety – results of an open, practice-oriented study with St John's wort WS® 5572 and valerian extract in high doses. *Phytomedicine*, 10: 25-30, 2003.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phys Plant*, 15: 473-497, 1962.
- Nowell, P. D.; Buysse, D. J. Treatment of insomnia in patients with mood disorders. *Depress Anxiety*, 14: 7-18, 2001.
- O'hara, M.; Kiefer, D.; Farrell, K.; Kemper, K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch Fam Med*, 7: 523-536, 1998.
- Ohayon, M. M.; Roth, T. Place of chronic insomnia in the course of depressive and anxiety disorders. *J Psychiatr Res*, 37: 9-15, 2003.
- Ortiz, J. G.; Nieves-Natal, J.; Chavez, P. Effects of *Valeriana officinalis* extracts on [3H]flunitrazepam binding, synaptosomal [3H]GABA uptake, and hippocampal [3H]GABA release. *Neurochem Res*, 24: 1373-1378, 1999.

- Petkov, V. Plants and hypotensive, antiatheromatous and coronarodilatating action. *Am J Chin Med*, 7: 197-236, 1979.
- Poyares, D. R.; Guillemineault, C.; Ohayon, M. M.; Tufik, S. Can valerian improve the sleep of insomniacs after benzodiazepine withdrawal? *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 26: 539-545, 2002.
- Pretty, J. N.; Morison, J. I. L.; Hine, R. E. Reducing food poverty by increasing agricultural sustainability in developing countries *Agric Ecosys & Environment*, 95: 217-234, 2003.
- Ramachandra Rao, S.; Ravishankar, G. A. Biotransformation of isoeugenol to vanilla flavour metabolites and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*: study of the influence of β -cyclodextrin and fungal elicitor. *Process Biochem*, 35: 341-348, 2002.
- Raskin, I.; David, M.; Ribnickya, D.M.; Komamytskya, S.; Ilicb, N.; Poulevb, A.; Borisjuka, N.; Brinkera, A.; Morenoa, D.A.; Ripolla, C.; Yakoby, N.; O'nealb, J.M.; Cornwella, T.; Pastorb, I.; Fridlenderb, B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotech*, 20: 522-531, 2002.
- Raza, M. A role for physicians in ethnopharmacology and drug discovery. *J Ethnopharmac*, 104: 297-301, 2006.
- Riedel, E.; Hansel, R.; Ehrke, G. Inhibition of gammaaminobutyric acid catabolism by valerenic acid derivatives. *Planta Med*, 46: 219-220, 1982.
- Rout, G. R.; Samantary, S.; Das, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol Adv*, 18: 91-120, 2000.
- Russowski, D.; Maurmann, N.; Rech, S. B.; Fett-Neto, A. G. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell Tiss Org*, 86: 211-218, 2006.
- Russowski, D. Produção de valepotriatos em culturas líquidas de plantas de *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae). Tese do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- Salles, L. A. Estabelecimento de culturas *in vitro* de *Valeriana glechomifolia*. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.
- Salles, L. A.; Silva, A. L.; Rech, S. B.; Zanatta, N.; Von Poser, G. L. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochem Syst Ecol*, 28: 907-910, 2000.
- Salles, L. A.; Silva, A. L.; Fett-Neto, A. G.; Von Poser, G. L.; Rech, S. B. *Valeriana glechomifolia*: *in vitro* propagation and production of valepotriates. *Plant Sci*, 163: 165-168, 2002.
- Sampaio, M. I. R.; Castilho, R. O.; Kaplan, M. A. C. Valerianaceae: etnofarmacologia, farmacologia e química. *Revista Brasileira de Farmácia*, 74: 54-56, 1993.
- Santos, M. S.; Ferreira, F.; Faro, C. The amount of GABA present in aqueous extracts of valerian is sufficient to account for [3H]GABA release in synaptosomes. *Planta Med*, 60: 475-476, 1994a.

- Santos, M. S.; Ferreira, F.; Cunha, A. P.; Faro, C. An aqueous extract of valerian influences the transport of GABA in synaptosomes. *Planta Med*, 60: 278-279, 1994b.
- Schenck, C. H.; Mahowald, M. W.; Sack, R. L. Assessment and management of insomnia. *J American Medical Association*, 289: 2475-2479, 2003.
- Silva, A. L. Quantificação de valepotriatos em espécies de valeriana e em culturas de calos e suspensões celulares de *Valeriana glechomifolia*. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
- Silva, A. L.; Rech, S. B.; Von Poser, G. L. Quantitative determination of valepotriates from valeriana native to south Brazil. *Planta Med*, 68: 570-572, 2002.
- Sobral, M. Valerianaceae. In: Flora ilustrada do Rio Grande do Sul. *Boletim do Instituto de Biociências*, UFRGS. 58: 1-61, 1999a.
- Sobral, M. *Valeriana tajuvensis* (Valerianaceae). A new species from southern Brazil. *Novon*, 9: 114-117, 1999b.
- Sobral, M. *Valeriana eupatoria* (Valerianaceae). A new species from Rio Grande do Sul. *Novon*, 10: 149-152, 1999c.
- Stevinson, C.; Ernst, E. Valerian for insomnia: a systematic review of randomized clinical trials. *Sleep Med*, 1: 91-99, 2000.
- Tang, Y.; Liu, X.; Yu, B. Iridoids from the rhizomes and roots of *Valeriana jamantasi*. *J Nat Prod*, 65: 1949-1952, 2002.
- Tesch, B. J. Herbs Commonly Used by Women: An Evidence-Based Review. *Reprinted from Clin J Women's Health*, 1: 89-102, 2001.
- Thanh, N. T.; Murthy, H. N.; Yu, K. W.; Jeong, C. S.; Hahn, E. J.; Paek, K. Y. Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. *J Plant Phys* (no prelo).
- Thies, P. W. Linarin-isovalerianate, a currently unknown flavonoid from *Valeriana wallichii* D.C. 6. Report on the active substances of valeriana. *Planta Med*, 16: 363-371, 1968.
- Tittel, G.; Wagner, H. High-performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of valepotriates in valeriana drugs and preparations. *J Chromatogr*, 148: 459-468, 1978.
- Trigiano, R. N.; Gray, D. J. *Plant Development and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, United States of America, 2005.
- Tori, M.; Yoshida, M.; Yokoyama, M.; Asakawa, Y. A guaiane-type sesquiterpene, valeracetate from *Valeriana officinalis*. *Phytochemistry*, 41: 977-979, 1996.
- Torsell, K.; Wahlberg, K. Isolation, structure and synthesis of alkaloids from *Valeriana officinalis* L. *Acta Chem Scand*, 21: 53-62, 1967.
- Tyler, V. *Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals*. Binghamton, NY, Pharmaceutical Products Press, p 209, 1994.
- Veith, J.; Schneider, G.; Lemmer, B.; Willems, M. The effect of degradation products of valepotriates on the motor activity of light-dark synchronized mice. *Planta Med*, 52: 179-183, 1986.

- Verpoorte, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *J Pharm Pharmacol*, 52: 253-262, 2000.
- Vidal, L. F.; Maurmann, N.; Rech, S. B. Estudos preliminares de aclimação fotossintética e crescimento de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.
- Violon, C. J.; Dekegel, D.; Vercruysse, A. Relation between valepotriate content and differentiation level in various tissues of Valerianeae. *J Nat Prod*, 47: 934-940, 1984.
- Vorbach, E. V.; Gortelmayer, R.; Bruning J. Therapie voninsomnien: wirksamkat und vertrglichkeit eines Baldrianpreparates. *Pharmakotherapie*, 3: 109-115, 1966.
- Wagner, H.; Jurcic, K. Uber die spasmodische wirkung des baldrians. *Planta Med*, 37: 84-86, 1979.
- Wagner, H.; Jurcic, K.; Schatte, R. Vergleichende Untersuchungen über die sedierende Wirkung Baldrianextrakten von und ihren Abbauprodukten. *Planta Med*, 38: 358-365, 1980.
- Wang, Z. Y.; Zhong, J. J. Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. *Bioch Engineering J*, 12: 93-97, 2002.
- Wasowski, C.; Marder, M.; Viola, H.; Medina, J. H.; Paladini, A. C. Isolation and identification of 6-methylapigenin, a competitive ligand for the brain GABA(A) receptors, from *Valeriana wallichii*. *Planta Med*, 68: 934- 936: 2002.
- White, P. R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. *Annual Review of Plant Physiology*, 2: 231-244, 1951.
- WHO, World Health Organization. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*, v. 1. Malta: WHO Graphics, 1999.
- Wiley, L. B.; Mady, S. P.; Cobauth, D. T.; Wax, P. M. Valerian overdose: a case report. *Vet Hum Toxicol*, 37: 2137-2145, 1995.
- Wills, R. B. H.; Shohet, D. Production of High Quality Australian Valerian Products. *A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Australian Governament*, 2003.
- Wong, A. H. C.; Smith, M.; Boon, H. S. Herbal remedies in psychiatric practice. *Arch Gen Psychiatry*, 55:1033–1044, 1998.
- Yuan, C. S.; Mehendale, S.; Xiao, Y.; Aung, H. H.; Xie, J. T.; Lee, M. K. A. The Gamma-Aminobutyric Acidergic effects of valerian and valerenic acid on rat brainstem neuronal activity. *Anesth Analg*, 98: 353-358, 2004.
- Zhong, J. J. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *J Biosc Bioeng*, 94: 591-599, 2002.

VII. Perspectivas de Continuidade do Trabalho

- Estudar o efeito dos tratamentos estressores cloreto de sódio (NaCl), Polietilenoglicol 8000 (PEG) e cloreto de alumínio na produção de valepotriatos e a atividade de enzimas anti-oxidantes nas plântulas de *V. glechomifolia*;
- Investigar no extrato contendo valepotriatos: o efeito protetor a convulsões, ansiolítico, mutagênico, genotóxico, atividade oxidante ou anti-oxidante e anti-tumorais.

VIII. *Curriculum Vitae* Resumido

MAURMANN, N.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Natasha Maurmann

Local e data de nascimento: Fortaleza, Ceará, Brasil – 15/11/1980.

Endereço profissional: Avenida Bento Gonçalves, Campus do Vale, 9500 Agronomia 91501-970 - Porto Alegre, RS Brasil.

Telefone profissional: 3316-6074 Fax: (51) 33165437

E-mail: natasha.maurmann@ufrgs.br_

2. FORMAÇÃO: graduação em Farmácia (UFRGS, 1999-2003); mestrado no Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS (2005-atual).

3. ESTÁGIOS:

Bolsas de iniciação científica

Título do projeto: “Estudo do estabelecimento de culturas *in vitro* de *Valeriana glechomifolia* e verificação da produção de valepotriatos”

Professor orientador: Dr. Sandra Beatriz Rech

Período: agosto/2000 a abril/2002

Local: Laboratório de Biotecnologia Vegetal / Faculdade de Farmácia / UFRGS

Órgão financiador: FAPERGS

Título do projeto: “Estudo do estabelecimento e análise fitoquímica de culturas celulares de *Valeriana glechomifolia*”

Professor orientador: Dr. Sandra Beatriz Rech

Período: maio/2002 a 2004

Local: Laboratório de Biotecnologia Vegetal / Faculdade de Farmácia / UFRGS

Órgão financiador: CNPq/UFRGS

Estágio curricular:

Professor responsável: Dr. Denise Bueno e Tânia Alves Amador

Período: agosto/2003 a janeiro/2004

Professor orientador: Dr. Tânia Amador e Farm. Marcelo Grocetti

Local: Farmácia Clinifarma

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Biancini. G. B.; Maurmann, N.; Rech, S.B.; Fett Neto, A. G. Efeito da concentração de nutrientes no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. Trabalho apresentado no XXVII Concurso acadêmico de Pesquisa Científica (CAPEC), realizado durante a XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia/UFRGS, classificado em segundo lugar.

Haas, J. S.; Bernardes, A. P. M.; Maurmann, N.; Rech, S. B.; Poser, G. L. V. Avaliação Química e Quantitativa de Compostos Fenólicos em *Hypericum polyanthemum*. XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica, Pró-reitoria de Pesquisa/UFRGS, 2005. Destaque da Sessão.

Luz, D.I.; Maurmann, N.; Carvalho, C.M.B.; Rech, S.B. Desenvolvimento e aclimação de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. Trabalho apresentado no XXIV Concurso acadêmico de Pesquisa Científica (CAPEC), realizado na XXIX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia/UFRGS, classificado em segundo lugar.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

Luz, D. I.; Maurmann, N.; Carvalho, C. M. B.; Rech, S. B. Desenvolvimento e aclimação de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. *Caderno de Farmácia*, 9(2): 89-92, 2003.

Carvalho, C. M. B.; Maurmann, N.; Luz, D. I.; Fett-Neto, A. G.; Rech, S. B. Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Reports*, 23: 251-255, 2004.

Maurmann, N.; Carvalho, C. M. B.; Silva, A. L.; Fett-Neto, A. G.; Von Poser, G. L.; Rech, S. B. Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 42: 50–53, 2006.

Russowski, D.; Maurmann, N.; Rech, S. B.; Fett-Neto, A. G. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 86: 211-218, 2006.

Bernardi, A. P. M.; Maurmann, N.; Rech, S. B.; Von Poser, G. L. Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum* (no prelo).

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Maurmann, N.; Vidal, L. F.; Streck, E.; Rech, S. B.; Fett Neto, A. G. Efeito da concentração de sais no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. In: V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Recife – Pe, 2005.

Russowski, D.; Maurmann, N.; Rech, S. B.; Fett Neto, A. G. Whole-plant liquid culture and valepotriate accumulation by *Valeriana glechomifolia*. In: XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal e X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Recife. Campinas: SBFV, 2005. v. 1.

Haas, J. S.; Bernardes, A. P. M.; Maurmann, N.; Rech, S. B.; Poser, G. L. V. Avaliação Química e Quantitativa de Compostos Fenólicos em *Hypericum polyanthemum*. In: XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

Vidal, L.F.; Maurmann, N.; Rech, S. B.; Estudos Preliminares de Aclimação Fotossintética e Crescimentos de Plântulas de *Valeriana glechomifolia*. In: XVII Salão de Iniciação Científica e XIV Feira de Iniciação Científica, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

Bernardes, A. P. M.; Maurmann, N.; Haas, J. S.; Rech, S. B.; Poser, G. L. V. Estabelecimento de culturas de calos de *Hypericum myrianthum*. In: V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2005, Recife-PE.

- Bernardes, A. P. M.; Luz, D.; Maurmann, N.; Poser, G. L. V.; Rech, S. B. *In vitro* propagation and chemical characterization of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt. In: *In Vitro* Biology Meeting. Meeting of the Society for *In Vitro* Biology, Baltimore, 2005.
- Maurmann, N.; Luz, D.; Mariotti, K. C.; Rech, S. B. Estudo preliminar da exudação de valepotriatos de plântulas de *Valeriana glechomifolia* cultivadas em meio líquido frente a diferentes agentes permeabilizantes. In: Livro de resumos do XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira de Iniciação Científica. POA: Editora da UFRGS, 16: 512-513, 2004.
- Luz, D.; Mariotti, K. C.; Maurmann, N.; Rech, S. B. Estudo comparativo do desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Valeriana glechomifolia* em meios semi-sólido e líquido de cultura. In: Livro de resumos do XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira de Iniciação Científica. POA: Editora da UFRGS, 16: 514-515, 2004.
- Mariotti, K. C.; Luz, D.; Maurmann, N.; Russowski, D.; Rech, S. B.; Fett Neto, A. G. Estudo comparativo do desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Valeriana glechomifolia* em meio semi-sólido e líquido de cultura. In: XII Jornada de Jovens Pesquisadores da AUGM, 2004, Curitiba, 2004.
- Russowski, D.; Maurmann, N.; Luz, D.; Rech, S. B.; Fett Neto, A. G. Estudo da produção de valepotriatos em plântulas de *Valeriana glechomifolia* clonadas em meio líquido. In: 50 Congresso Brasileiro de Genética, Florianópolis, 2004.
- Maurmann, N.; Rech, S. B.; Estudo da exsudação de valepotriatos e da sobrevivência de plântulas de *Valeriana glechomifolia* cultivadas em meio líquido frente a diferentes agentes permeabilizantes. Revista Caderno de farmácia, 20(1): 69-70, 2004.
- Maurmann, N.; Luz, D.; Carvalho, C. M. B.; Russowski, D.; Poser, G. L. V.; Fett Neto, A. G.; Rech, S. B. Propagação *in vitro* de *Valeriana glechomifolia* e produção de valepotriatos. In: XI Jornadas de Jovenes Investigadores de AUGM. Associação das Universidades do Grupo de Montevideo, La Plata, 1: 360, 2003.
- Maurmann, N.; Bernardes, A. P. M.; Luz, D.; Ferraz, A.; Poser, G. L. V.; Rech, S. B. Influência de reguladores de crescimento na indução de calos em explantes foliares de *Hypericum ternum*. In: IV Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Sociedade Brasileira de Farmacognosia, Salvador, 2003.
- Maurmann, N.; Luz, D.; Carvalho, C. M. B.; Russowski, D.; Poser, G. L. V.; Fett Neto, A. G.; Rech, S. B. Caracterização do crescimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia*. In: IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Atibaia-SP. 1: 26, 2003.
- Maurmann, N. ; Luz, D.; Carvalho, C. M. B.; Poser, G. L. V.; Fett Neto, A. G.; Rech, S. B. Análise do crescimento e da produção de valepotriatos em plântulas micropropagadas de *Valeriana glechomifolia*. In: IV Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Salvador (Ba). 1: FG4, 2003.
- Mariotti, K. C.; Luz, D.; Maurmann, N.; Rech, S. B. Desenvolvimento e aclimação de plântulas de *Valeriana glechomifolia*. In: Livro de Resumos do XV Salão e XII Feira de Iniciação Científica da UFRGS. POA: Editora da Universidade, 15: 654, 2003.
- Nor, C.; Bernardes, A. P. M.; Luz, D.; Ferraz, A.; Maurmann, N.; Rech, S. B.; Poser, G. L. V. Identificação de substâncias de *Hypericum ternum* *in natura* e de culturas *in vitro*. In: Livro de resumos do XV Salão e XII Feira de Iniciação Científica da UFRGS. POA: Editora da Universidade. 15: 655, 2003.

Maurmann, N.; Luz, D.; Carvalho, C. M. B.; Rech, S. B. Caracterização do crescimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 15, 2003.

Maurmann, N.; Castro, A. P. S.; Rech, S. B.; Poser, G. L. V.; Silva, A. L. Influência de reguladores de crescimento na produção *in vitro* de valepotriatos em suspensões celulares de *Valeriana glechomifolia* Meyer. In: Livro de Resumos do XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre. 2002.

Carvalho, C. M. B.; Maurmann, N.; Luz, D.; Fett Neto, A. G.; Rech, S. B. Otimização da micropropagação e enraizamento de *Valeriana glechomifolia* Meyer. In: XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Cuiabá. p. BO060, 2002.

Carvalho, C. M. B.; Maurmann, N.; Poser, G. L. V.; Rech, S. B. Estabelecimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia* Meyer. In: XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Cuiabá, 2002.

Bernardes, A. P. M.; Maurmann, N.; Ferraz, A.; Poser, G. L. V.; Rech, S. B. Micropropagação de *Hypericum ternum* A. St. Hil.. In: XVII simpósio de plantas medicinais do Brasil, Cuiabá, 2002.

Bernardes, A. P. M.; Albring, D. V.; Ferraz, A.; Bordignon, S.; Maurmann, N.; Rech, S. B.; Poser, G. L. V. Propagação *in vitro* de *Hypericum ternum* A. St. Hill e análise química das plântulas produzidas. In: Livro de resumos do XIV Salão de Iniciação Científica e XI Feira de Iniciação Científica da UFRGS, 14: 503, 2002.

IX. Anexos de trabalhos publicados

Demais atividades desenvolvidas concomitante ao mestrado.

In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 42:50–53, January–February 2006
 © 2006 Society for In Vitro Biology
 1054-5476/06 \$18.00+0.00

DOI: 10.1079/IVP2005725

VALEPOTRIATES ACCUMULATION IN CALLUS, SUSPENDED CELLS AND UNTRANSFORMED ROOT CULTURES OF *VALERIANA GLECHOMIFOLIA*

NATASHA MAURMANN², CARINA M. B. DE CARVALHO¹, ANDRÉIA LOVIANE SILVA¹, ARTHUR G. FETT-NETO², GILSANE L. VON POSER¹,
 AND SANDRA B. RECH^{1*}

¹PPG Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS 90610.000, Brazil

²PPG Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501.970, Brazil

(Received 1 April 2005; accepted 16 November 2005; editor H. M. Schumacher)

SUMMARY

Valeriana glechomifolia is an endemic species of southern Brazil, capable of accumulating, in all of its organs, the terpene derivatives known as valepotriates, the presumed sedative components of the roots of pharmaceutically used species of *Valeriana*. *In vitro* cultures of the plant were established and the accumulation of acevaltrate, didrovaltrate, and valtrate in callus, cell suspension, and untransformed root cultures was studied. Leaves of *in natura* plants and roots of micropropagated plantlets were used as the explants for callus induction and root culture establishment, respectively, on Gamborg B5 basal medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) alone or with kinetin (KIN). Culture growth and secondary metabolite yields were enhanced with 2,4-D (4.52 μM) and KIN (0.93 μM). Maximum valepotriate contents, quantified by HPLC, of acevaltrate (ACE) 2.6 mg g^{-1} DW, valtrate (VAL) 10.2 mg g^{-1} DW, and didrovaltrate (DID) 2.9 mg g^{-1} DW were observed in root cultures after 7–8 wk of culture.

Key words: acevaltrate; didrovaltrate; HPLC; *in vitro* cultures; *Valeriana*; valtrate.

INTRODUCTION

Plants of the genus *Valeriana* produce iridoid esters of biotechnological interest, known as valepotriates (Backlund and Moritz, 1998) which, together with valerenic acids, are considered the constituents responsible for the sedative effect of roots and rhizomes of some species of the genus (Houghton, 1999; Herrera-Arellano et al., 2001). Of the nine endangered *Valeriana* species distributed in southern Brazil (Sobral, 1999), *Valeriana glechomifolia* is the richest in valepotriates (Salles et al., 2000; Silva et al., 2002); the valepotriates are found in both aerial and subterranean parts of this plant.

Plant cell cultures may offer an alternative for a controlled production of biologically active compounds, and root cultures can display high biosynthetic capability (Pras, 2000). Production of valepotriates have been studied in tissue cultures of different species of the *Valerianaceae* (Becker and Schroll, 1980; Violon et al., 1984), in root cultures of *Valeriana wallichii* DC (Becker and Chavadej, 1988) and in hairy roots of *Valerianella officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan (Gränicher et al., 1992), *V. wallichii* DC (Banerjee et al., 1998), *Valerianella discoidea* (L.) Loisel (Caetano et al., 1999), and *Valeriana locusta* (Kittipongpatana et al., 2002).

A protocol for *in vitro* propagation of *V. glechomifolia* was established (Salles et al., 2002), and the study of the influence of the auxins indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), and

α -naphthaleneacetic acid (NAA) on plantlet propagation demonstrated that the best performance in valepotriate production, growth, and survival in *ex vitro* conditions after plant acclimatization was achieved with the continuous presence of 5.71 μM IAA. This condition yielded plants with stable levels of valepotriates throughout the cultivation period (De Carvalho et al., 2004).

This study was conducted to evaluate production of valepotriates in *V. glechomifolia* callus, cell suspension, and untransformed root cultures and to compare the yields of these secondary metabolites with *in vitro* regenerated plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and culture methods. The plant material was collected in April 1998 in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The species was identified by M. Sobral and a voucher specimen (Sobral, 7733) was deposited in the Herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN). Leaves were excised, thoroughly washed with tap water, surface sterilized in 70% EtOH for 1 min, rinsed twice with sterile-distilled water, immersed in 1.5% sodium hypochlorite for 10 min, and rinsed four times with sterile-distilled water.

For callus induction, leaves (c. 9×7 mm) were cultured in Petri dishes with 20 ml of Gamborg B5 medium (Gamborg et al., 1968) containing 15 g l^{-1} of polyvinylpyrrolidone (PVP), 30 g l^{-1} sucrose, 2,4-D (0, 4.52, 9.05, or 18.10 μM), and KIN (0, 0.93, 2.32, or 4.65 μM). The pH of the medium was adjusted to 5.7 and agar (extra pure, Merck) was added at 7 g l^{-1} before autoclaving for 20 min at 121°C. The cultures were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, in the dark or under 16 h light ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/8 h dark. The treatments were arranged as a 6 (2,4-D concentration) \times 4 (KIN concentration) factorial in a completely randomized design with 10 replicates per treatment. Calluses formed with 4.52 μM 2,4-D (medium I)

*Author to whom correspondence should be addressed: Email sandrar@farmacia.ufrgs.br

or with 4.52 μM 2,4-D + 0.93 μM KIN (medium II) and were subcultured every 4 wk; fresh weight (FW) and dry weight (DW), assessed by freeze drying), and valepotriate yields were recorded monthly.

Friable callus (c. 10 g FW after 10 subcultures) was cultured in 50 ml liquid Gamborg B5 medium supplemented with 4.52 μM 2,4-D alone (medium I) or with 0.93 μM KIN (medium II) in 250 ml Erlenmeyer flasks. Cultures were maintained in the dark on a rotatory shaker (100 rpm) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, and the subculture was performed every 15 d. Cell FW and DW, as well as valepotriate yields, were recorded at 4 d intervals for 30 d. The experiment was conducted with three replicates per time in two independent experiments.

For the establishment of untransformed root cultures, roots of plantlets of *V. glechomifolia* maintained for 4 yr on MS (Murashige and Skoog, 1962) medium without growth regulators (MS₁ plantlets), or supplemented with 1.78 μM of BA (MS₄ plantlets), were used (Salles et al., 2002). Roots excised from 2-mo.-old micropropagated MS₁ and MS₄ plantlets were cultured in liquid medium supplemented with 4.52 μM 2,4-D (medium I) or with 4.52 μM 2,4-D + 0.93 μM KIN (medium II) in the dark on a rotatory shaker (100 rpm) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and subcultured at intervals of 4 wk for 1 yr. For time-course experiments, 10-d-old pre-cultured root tissues (1.0 g) were inoculated in fresh liquid medium II (25 in 125 ml Erlenmeyer flasks). Roots' FW and DW and valepotriate contents were recorded at 7-d intervals for 9 wk with three replicates in three independent experiments.

Valepotriate determinations. The chemical extraction of the lyophilized *in vitro* cultures and the high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of valepotriates were performed according to the previously reported procedure (Silva et al., 2002). The powdered material was extracted five times at room temperature with chloroform under 30-min sonication (Ultrasonic[®], São Paulo, Brazil). The extract was dissolved in methanol to obtain a concentration of 1 mg ml⁻¹, filtered through a membrane filter (0.22 μm pore size, Merck) and analyzed by HPLC in a Shimadzu instrument consisting of a LC-10AD pump, an SPD-10A UV detector and an automatic injector (SIL-10A) with a 20 μl sample loop (Waters Nova-Pack C18 column: 4 μm , 3.9 \times 150 mm i.d. with Waters Nova-Pack C18 guard column: 60 Å, 3.9 \times 20 mm; isocratic: CH₃CN/H₂O, 50:50 (v/v); 1 ml min⁻¹; detector sensitivity: 1.0 AUF; 254 nm for dienic valepotriates and 208 nm for the monoenic valepotriate). Retention times were 18.1 min (ACE), 19.8 min (DID) and 34.8 min (VAL). The valepotriates used as external standards were isolated as described elsewhere (Salles et al., 2000). The identity and purity of the compounds were confirmed by ¹H-NMR (Salles, 1999).

ANOVAs were followed by Tukey test (Sokal and Rohlf, 1981). A critical value of $P \leq 0.05$ was used for all statistical tests.

RESULTS AND DISCUSSION

Induction of callus from leaves of *V. glechomifolia* was completely inhibited in the presence of light and in the absence of 2,4-D in the medium. Callus cultures grown on media I and II doubled in biomass (FW) every 4 wk of culture in the dark and were sufficiently friable for the establishment of cell suspension cultures.

HPLC analysis showed that the extracts of callus and suspended cells accumulated the valepotriates present in the leaves of the mother plant (Salles et al., 2002), and the main compounds were quantified. The contents of ACE and VAL in the callus cultures (Table 1) were greater than in the leaves of field-grown plants and comparable to those of micropropagated plant leaves. The contents of valepotriates were lower in suspended cell cultures than in callus cultures, except for DID (Table 1), and on both cultures the presence of KIN in the medium was beneficial to valepotriate accumulation (Table 1).

Considering the increase in biomass and valepotriate yield, suspended cell cultures grown with 2,4-D and KIN were the most productive cultures achieving maximum growth (45 g of FW/1.03 g DW) after 28 d. Maximum valepotriate accumulation (0.267% DW ACE, 0.216% DW VAL and 0.143% DW DID) was observed after 22 d of culture.

Untransformed root cultures maintained *in vitro* for 1 yr were investigated for the presence of ACE, VAL, and DID by HPLC. The analysis showed that the cultures retained the capacity for production of ACE and VAL, whereas DID was detected only in MS₄-cultured roots (Table 1). In particular, the cultivation of MS₄ roots (roots derived from plantlets grown in MS medium supplemented with 1.78 μM 6-benzylaminopurine, BA) with 2,4-D and KIN led to an

TABLE 1

VALEPOTRIATES IN CALLUS, SUSPENDED CELL, AND UNTRANSFORMED ROOT CULTURES OF *VALERIANA GLECHOMIFOLIA* GROWN ON GAMBORG B5 LIQUID MEDIUM FOR 4 WK

	% Content (dry weight)		
	Acevaltrate	Valtrate	Didrovaltrate
Leaves of field-grown plants	0.142	0.190	0.126
Leaves of <i>in vitro</i> -grown MS ₁ plantlet (no growth regulators)	0.360	0.290	0.058
Leaves of <i>in vitro</i> -grown MS ₄ plantlet (BA)	0.460	0.400	0.010
Roots of MS ₁ plantlet (no growth regulators)	0.320	0.290	0.057
Roots of MS ₄ plantlet (BA)	0.440	0.080	0.020
Callus cultures (2,4-D) ^a	0.476 \pm 0.001 a	0.377 \pm 0.027 b	0.058 \pm 0.009 b
Callus cultures (2,4-D + KIN) ^a	0.515 \pm 0.004 a	0.610 \pm 0.070 a	0.122 \pm 0.019 a
Suspended cells (2,4-D) ^a	0.113 \pm 0.030 c	0.095 \pm 0.009 de	0.117 \pm 0.015 a
Suspended cells (2,4-D + KIN) ^a	0.267 \pm 0.044 b	0.161 \pm 0.054 cd	0.110 \pm 0.006 a
Untransformed root cultures MS ₁ (2,4-D) ^a	0.051 \pm 0.008 de	0.075 \pm 0.091 de	Nd
Untransformed root cultures MS ₁ (2,4-D + KIN) ^a	0.025 \pm 0.002 e	0.036 \pm 0.002 e	Nd
Untransformed root cultures MS ₄ (2,4-D) ^a	0.079 \pm 0.008 cd	0.209 \pm 0.046 c	0.086 \pm 0.024 ab
Untransformed root cultures MS ₄ (2,4-D + KIN) ^a	0.125 \pm 0.009 c	0.647 \pm 0.086 a	0.099 \pm 0.012 ab

Nd, not detected.

^aThese plant materials and corresponding numbers were statistically compared within columns (experiments conducted for this report). Means sharing a letter within a column are not significantly different (Tukey test, $P \leq 0.05$); Numbers after \pm are standard errors. Other plant sources and numbers were taken from Salles et al. (2002) for the purpose of overall direct comparison

increase of ACE and VAL contents being the concentration of the latter higher than the production observed in the roots of plantlets and roots of field-grown plants (Salles et al., 2002).

The growth of MS₄ root cultures on medium II was characterized as the relative biomass increase over a 9-wk period. Maximum biomass (dry and fresh weight) was achieved after 7–8 wk of culture (Fig. 1a), whereas the content of valepotriates decreased at early logarithmic phase until week 4 and afterwards increased in parallel with root growth, reaching maximum yield at weeks 7 and 8 (Fig. 1b). VAL was the main valepotriate accumulated with a maximal content of 10.2 mg g⁻¹ DW, whereas the yields of ACE and DID were 2.6 mg g⁻¹ DW and 2.9 mg g⁻¹ DW, respectively. Despite the relatively low multiplication rate of the cultures, the levels of VAL and ACE were superior or equivalent to those quantified for acclimatized *V. glechomifolia* plants originated from MS medium without growth regulators and with 5.71 μM IAA, respectively, after 3 mo. of *ex vitro* growth (De Carvalho et al., 2004). To overcome the culture's slow growth, further studies will focus on the establishment of hairy roots cultures and on the investigation of biomass metabolite production scale up.

DIA-valtrate and 1-β-acevaltrate, present in the roots of the parent plant (Salles et al., 2002), were also detected in the untransformed root cultures. Moreover, valepotriates were not significantly released into the culture medium during the experiment.

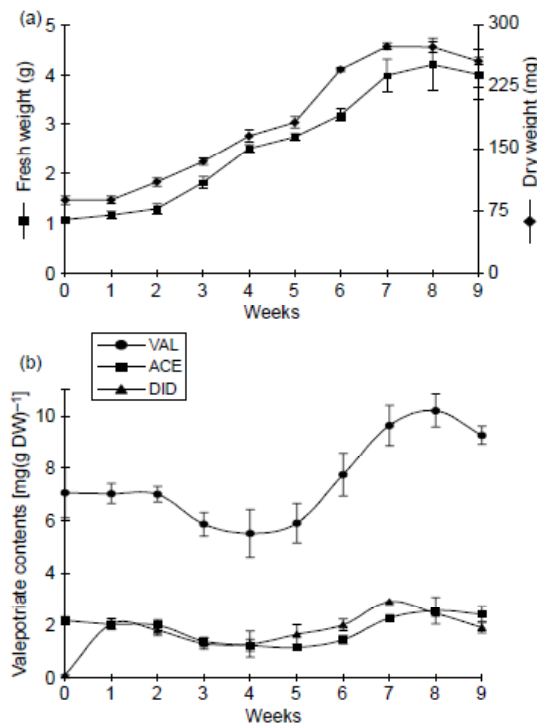


FIG. 1. Time-course of growth and valepotriate accumulation in MS₄ untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia* in Gamborg B5 liquid medium containing 2,4-D and KIN. a, Accumulation of fresh and dry weight; b, accumulation of valtrate, acevaltrate and didrovaltrate. The bars indicate standard errors of the means of three replicates.

Our study demonstrated that callus, suspended cell, and untransformed root cultures of *V. glechomifolia* were able to accumulate ACE, VAL, and DID. The presence of DID, however, depends on the medium used for the initiation of the root cultures (Salles et al., 2002). Furthermore, the addition of KIN in the medium had little effect on the growth of the cultures but promoted valepotriate formation in cultures with a low degree of differentiation (callus and cell suspensions). This is in contrast to what was observed in micropropagated plantlets, which tended to accumulate relatively lower contents of valepotriates when maintained on BA containing medium (MS₄) (Salles et al., 2002; Table 1).

Differentiated root cultures derived from plantlets grown in a cytokinin-containing medium (MS₄) increased the valepotriate content upon culture in a KIN-containing medium, but root cultures derived from plantlets grown in the absence of cytokinin had a reduced valepotriate content upon growth in KIN-containing medium (Table 1). These contrasting responses could be associated with differences in cytokinin homeostasis and sensitivity in various tissues with distinct degrees of differentiation. The maintenance of valepotriate biosynthetic capacity in different types of *V. glechomifolia* cultures in media with 2,4-D as the main phytohormone is in agreement with the early observation that 2,4-D did not inhibit valepotriate production by *V. officinalis* root cultures (Violon et al., 1984). The systems herein described can be further investigated to optimize secondary metabolite production and analyze valepotriate biosynthesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Brazilian agencies CAPES, CNPq, FAPERGS, and Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ)-UFRGS.

REFERENCES

- Backlund, A.; Moritz, T. Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 26:309–335; 1998.
- Banerjee, S.; Rahman, L.; Uniyal, G. C.; Ahuja, P. S. Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy roots cultures of *Valeriana wallichii* DC. *Plant Sci.* 131:203–208; 1998.
- Becker, H.; Chavadej, S. Valepotriates production by plant cell cultures. In: Bajaj, Y. P. S., ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 49. Berlin: Springer-Verlag; 1988:294–307.
- Becker, H.; Schroll, R. Valepotriates in tissue cultures of nine different Valerianaceae species in comparison to literature data of the intact plants. *J. Nat. Prod.* 43:721–723; 1980.
- Caetano, L. C.; Charwood, B. V.; Gahan, P. B. The localization and accumulation of valepotriates in hairy roots cultures of *Valeriana discoides* (L.) Loisel. *Phytochem. Anal.* 10:181–186; 1999.
- De Carvalho, C. M. B.; Maurmann, N.; Luz, D. I.; Fett-Neto, A. G.; Rech, S. B. Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Rep.* 23:251–255; 2004.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151–158; 1968.
- Gränicher, F.; Christen, P.; Kapetanidis, I. High yield production of valepotriates by hairy root cultures of *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia* Mikan. *Plant Cell Rep.* 11:339–342; 1992.
- Herrera-Arellano, A.; Luna-Villegas, G.; Cuevas-Uriostegui, M. L.; Alvarez, L.; Vargas-Pineda, G.; Zamilpa-Alvarez, A.; Tortoriello, J. Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. *Planta Med.* 67:695–699; 2001.
- Houghton, P. J. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *J. Pharm. Pharmacol.* 51:505–512; 1999.

- Kittipongpatana, N.; Davis, D. L.; Porter, J. R. Methyl jasmonate increases the production of valepotriates by transformed root cultures of *Valerianaella locusta*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 71:65–75; 2002.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–497; 1962.
- Pras, N. The encyclopedia of cell technology. New York: Wiley; 2000.
- Salles, L. A. Estudo fitoquímico e estabelecimento de culturas de calos de *Valeriana glechomifolia* Meyer. MSc thesis, Pharmacy School, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil; 1999.
- Salles, L. A.; Silva, A. L.; Fett-Neto, A. G.; von Poser, G. L.; Rech, S. B. *Valeriana glechomifolia*: *in vitro* propagation and production of valepotriates. *Plant Sci.* 163:165–168; 2002.
- Salles, L. A.; Silva, A. L.; Rech, S. B.; Zanatta, N.; von Poser, G. L. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochem. Syst. Ecol.* 28:907–910; 2000.
- Silva, A. L.; Rech, S. B.; von Poser, G. L. Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to south Brazil. *Planta Med.* 68:570–572; 2002.
- Sobral, M. Flora ilustrada do rio grande do sul: valerianaceae. *Bol. Inst. Biociên.* 58:1–61; 1999.
- Sokal, R. R.; Rohlf, F. J. *Biometry*. San Francisco: W.H. Freeman; 1981.
- Violon, C.; Dekegel, D.; Vercrusysse, A. Relation between valepotriate content and differentiation level in various tissues from Valerianaceae. *J. Nat. Prod.* 47:934–940; 1984.

Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures

Denise Russowski · Natasha Maurmann ·
 Sandra Beatriz Rech ·
 Arthur Germano Fett-Neto

Received: 17 January 2006 / Accepted: 5 April 2006 / Published online: 7 July 2006
 © Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract A system for growing in liquid medium whole plants of *Valeriana glechomifolia*, endemic to southern Brazil and capable of accumulating bioactive valepotriates, is described. Murashige and Skoog (MS) and Gamborg B5 (B5) media (1.0×, 0.3× and 0.1× strength) without phytohormones were evaluated after four weeks of culture in relation to growth and valepotriate yield. Plants grown in 1.0× MS displayed greatest growth and valepotriate yields and the study of the light condition showed that plants grown under light and dark had similar weight increase and maximum valepotriate yield, 27.2 mg/g DW and 25.0 mg/g DW, respectively. Valtrate was the most abundant valepotriate, followed by acevaltrate and didrovaltrate.

Keywords Micropropagation · Light ·
Valerianeae · *Valeriana glechomifolia* ·
 Valepotriates

Abbreviations

ACE	Acevaltrate
DID	Didrovaltrate
B5	Gamborg B5 medium
GI	Growth Index
MS	Murashige and Skoog medium
VAL	Valtrate

Introduction

Plants of the genus *Valeriana* have sedative, antispasmodic and relaxing properties attributed to the iridoid esters, known as valepotriates (Backlund and Moritz 1998), as well as to the valerenic acids. These molecules are predominantly produced in the subterranean parts of intact plants (Houghton 1999; Herrera-Arellano et al. 2001). Valepotriates also have been shown to have antifungal (Fuzzati et al. 1996) and cytotoxic (Bounthan et al. 1981; Bos et al. 1998a) activities. As an alternative to obtain these active compounds of pharmaceutical interest, some species have been investigated: *V. officinalis*, cultivated in Europe on a large scale (Bos et al. 1998b); *V. wallichii*, native to the Himalayas (Mathur et al. 1988), and *V. edulis* originated from Central America (Castillo et al. 2002).

D. Russowski · N. Maurmann · A. G. Fett-Neto (✉)
 Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e
 Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Caixa
 Postal 15005, 91501-970 Porto Alegre, Brazil
 e-mail: fettneto@cbiot.ufrgs.br

S. B. Rech
 Programa de Pós Graduação em Ciências
 Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752,
 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

Valeriana glechomifolia is an endemic species of southern Brazil, capable of accumulating in all of its organs the terpene derivatives valepotriates (Silva et al. 2002). The plant can not be easily propagated by seeds and was successfully propagated in vitro through tissue culture (Salles et al. 2002). The growth kinetics in solid medium demonstrated that the continuous presence of 5.71 μM of IAA yielded plants with stable levels of valepotriates (De Carvalho et al. 2004). However, its small size and low biomass of individuals require an efficient system to improve the production of genetically homogeneous plants and to provide a source of bioactive compounds for the long term supply of crude drugs.

Liquid cultures are ideal in micropropagation for vigorous growth, reducing plantlet production costs and for automation (Etienne and Berthouly 2002). Bioreactor technologies are regarded as key factors for mass propagation of selected sterile plants in optimized environmental conditions, and experimental equipment for shoot cultures have been developed with the aim of reducing the production cost while maximizing plant growth (Bondarev et al. 2003; Murch et al. 2003; Liu et al. 2004). However, most of the shoot cultures are sensitive to shear stress and may vitrify after prolonged liquid culture (Liu et al. 2001). Therefore, the objective of the current study was to develop a liquid system that can provide adequate biological requirements for in vitro propagation of whole *V. glechomifolia* plantlets, and to further investigate factors modulating biomass generation and phytochemical composition of the plants.

Materials and methods

Plant material

Shoot tips (1 cm) isolated from two-month-old micropropagated *V. glechomifolia* were obtained as described by Salles et al. (2002). Plantlets used in the experiments were grown on MS medium (Murashige and Skoog 1962) containing 3% sucrose and 0.6% agar (extra pure, Merck), at pH 5.7. Prior to inoculation in liquid medium, plantlets were grown in 25 ml solid medium for eight

weeks, maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, under a 16 h photoperiod provided by cool white fluorescent lamps (approximately $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Plantlets weighing $0.65 \pm 0.19 \text{ g}$ (mean \pm SD, $n = 530$) were placed on circular membranes with a small central orifice (to allow roots to contact the medium) and transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of MS or B5 (Gamborg et al. 1968) medium, at full, 0.3 \times or 0.1 \times strength, containing 3% sucrose, without plant growth regulators, and capped with aluminum foil (Fig. 1A). Plantlets were grown on a rotatory shaker (Innova 2350, New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ) at 100 rpm under the same conditions described above. After four weeks, the residual medium volumes were recorded and plantlets were rinsed, blotted dry, and their FW was measured. Then, plants were freeze-dried for DW and valepotriate determination. Culture media were also freeze-dried for analysis of released valepotriates. In order to minimize differences in growth that may have been the result of variation in initial plantlet size, the Growth Index (GI) = $(\text{weight}_{\text{final}} - \text{weight}_{\text{initial}}) / \text{weight}_{\text{initial}}$, was also used to evaluate growth.

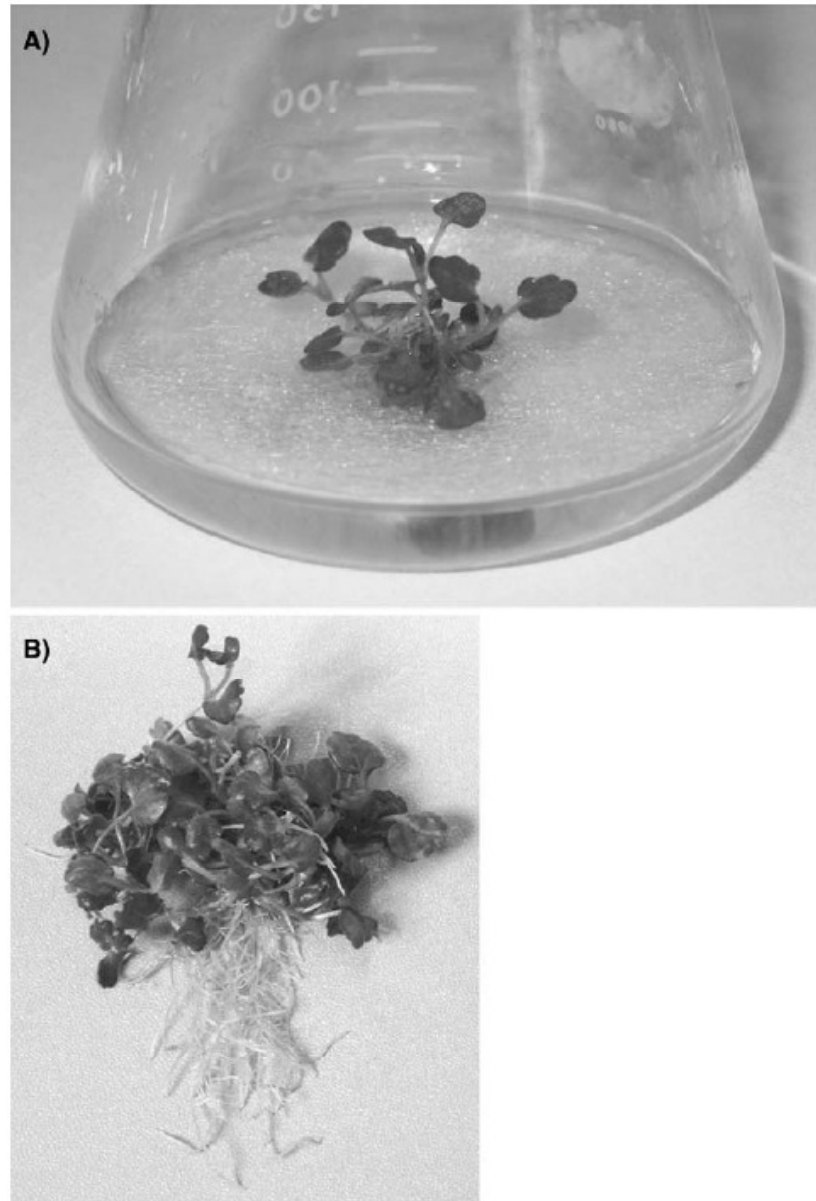
In a second set of experiments, plantlets were grown in 1.0 \times MS medium under the same conditions described above, and plant development and valepotriate contents were evaluated at seven-day intervals for seven weeks. Every week, the residual medium volumes were recorded, and plants were rinsed, blotted dry, and, after fresh weight and growth index determination, plants were freeze-dried for measuring the DW and valepotriate content.

In a third set of experiments, plants were grown on 1.0 \times MS medium as described above and were kept under dark and light conditions. Growth index, DW, root and leaf number, and valepotriate yields were recorded at seven-day intervals for 35 days.

Valepotriate extraction and analyses

The chemical extraction of the lyophilized in vitro cultures and nutrient solutions and the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis of valepotriates were performed according to Silva et al. (2002). The powdered material

Fig. 1 *V. glechomifolia* liquid culture propagation system: **(A)** Two-month-old plants grown on solid medium transferred to a membrane raft and cultured in 250 ml flask containing 50 ml of liquid medium without plant growth regulators. **(B)** Plant after four weeks of growth on 1.0× MS liquid medium (width of shoots = ~5 cm)



was extracted four times at room temperature with chloroform under 20 min sonication (Ultrasonic®, São Paulo, Brazil). The extract was dissolved in methanol to obtain a concentration of 1 mg/ml, filtered through a membrane filter (0.22 μm pore size, Merck) and analysed by HPLC in a Shimadzu instrument consisting of a LC-10AD pump, a SPD-10A UV detector and an automatic injector (SIL-10^A) with a 20 μl sample

loop. A Waters Nova-Pack C18 column (4 μm , 3.9 \times 150 mm i.d. with Waters Nova-Pack C18 guard column, 60 \AA , 3.9 \times 20 mm) was the stationary phase; the mobile phase was isocratic: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 50:50 (v/v); flow rate of 1 ml min^{-1} . Detector sensitivity was set to 1.0 AUFs; wavelengths used were 254 nm (dienic valepotriates) and 208 nm (monoenic valepotriate). Valtrate, acevaltrate and didrovaltrate, used as external

standards, were isolated from *V. glechomifolia* as described by Salles et al. (2000). The valepotriates (10 mg each) were individually dissolved in methanol, diluted stepwise (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 and 0.03125 mg/ml), and 10 μ l were injected into the HPLC in triplicate. The calibration plots were generated by measuring their respective peak areas and linear regression equations were calculated.

Statistical analysis

In all of the experiments, the layout was totally randomized. All treatments had five replicates and each experiment was independently carried out at least three times. One-way or two-way Analysis of Variance (ANOVA) and Duncan test were applied with a critical value of $P \leq 0.05$. Data transformation was done as recommended to satisfy ANOVA requirements (Sokal and Rohlf 1981).

Results and discussion

Valeriana glechomifolia grown in liquid medium produced plants with significant increase of biomass without hyperhydricity (Fig. 1B) when compared with plants grown in semi-solid medium (De Carvalho et al. 2004). The higher growth values could be explained by a better contact between the explants and liquid medium, which increases the availability and ability for nutrient uptake, and by the aeration provided by agitation. Biomass produced after four weeks of culture was influenced by the concentration of the medium with better values displayed by plants grown in MS and B5 full concentration (Fig. 2 A, B).

Valepotriate yields also improved with media concentration (Fig. 2C), except for 1.0 \times B5 grown plants, in which the content of these metabolites did not increase, even with a corresponding better growth. The most prominent difference between MS and B5 media is the lower $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio present in B5 medium. It is possible that this difference in proportion of N sources, combined with full strength concentration, may have influenced valepotriate yields. Similar results have been reported for taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*, which were influenced by

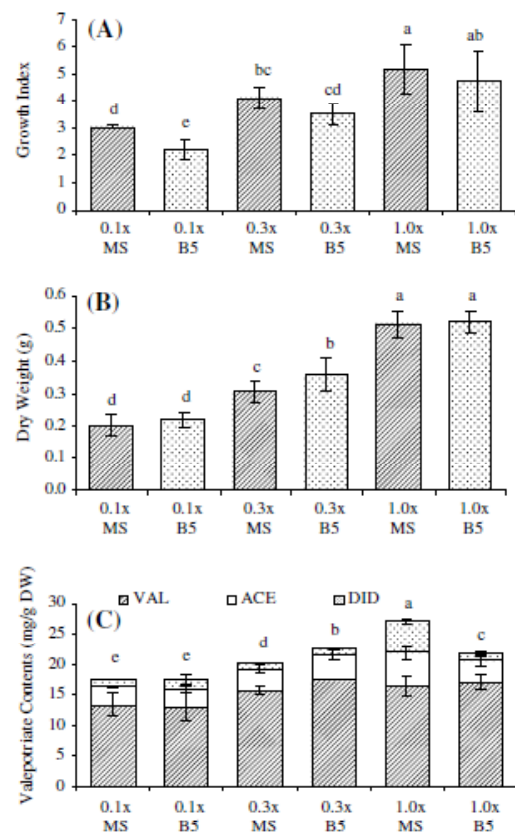


Fig. 2 Effect of MS (Murashige and Skoog) and B5 (Gamborg B5) media on growth (A and B) and valepotriate contents (VAL—valtrate, ACE—acevaltrate, DID—didrovaltrate) (C) of *V. glechomifolia* plants grown in liquid culture. Values are means of three different experiments \pm SD ($n = 15$). Bars sharing a letter within graphs are statistically equivalent ($P < 0.05$)

the nitrogen source, proportion and concentration in the medium (Chen et al. 2003). Nevertheless, except for 1.0 \times MS medium, the responses to changes in nutrient composition had only minor effects on the ratio of individual valepotriates accumulated in the plants. The overall data indicate a growth-dependent accumulation of valepotriates in plants of *V. glechomifolia*, in agreement with previous data reported for transformed root cultures of *Valerianella* sp. (Kittipongpatana et al. 2002).

The analysis of valepotriates in the nutrient solution demonstrated that the plants spontaneously released small quantities of these

compounds. The analysis, performed in the different media after four weeks of growth, yielded approximately 0.5 mg/l medium of total valepotriate yields (data not shown), maintaining the same the ratio of individual valepotriates accumulated in the plants. Considering the relatively small concentrations of valepotriates released by the plants to the liquid medium, the quantification on the nutrient solution was not further analysed nor added to the valepotriate concentration in plants for yield determination. Reports showing that valepotriates were entirely retained in tissues of hairy root cultures of *V. officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan (Gränicher et al. 1992) and in hairy root cultures of *V. wallichii* DC (Banerjee et al. 1998) are in agreement with the small release observed in the whole plant cultures of *V. glechomifolia*. Nevertheless, the permeabilization of cells and tissues for secondary metabolite release can be investigated with techniques described for other medicinal plants (Gontier et al. 2002).

The comparison of results of growth and valepotriate production indicated the use of 1.0× MS medium for further experiments. Although not tested in the present study, an intermediate concentration between 0.3 and 1.0× MS may yield equivalent results on these parameters compared to 1.0× MS. The study of plant growth kinetics showed that 1.0× MS medium contained enough nutrients to allow a growth cycle of seven weeks for *V. glechomifolia* plants; there was a four-day lag phase before plants started to grow. Dry weight (Fig. 3A) and GI (Fig. 3B) of the plants increased progressively up to six weeks (0.73 ± 0.05 g and 7.94 ± 1.4 , respectively). Weight decreased to 0.52 ± 0.12 g (GI 7.3 ± 1.3) by day 49. Plants grown for 28 days grew normally after ex-vitro transfer and resulted in plants of normal morphology (data not shown). Total valepotriate yields decreased during the lag phase and started to increase steadily from 14.1 ± 2.6 mg/g DW on day 7 to reach a maximum of 27.2 ± 4.7 mg/g DW on day 28 (Fig. 3A). The valepotriate contents decreased rapidly after 35 days to 10.8 ± 2.5 mg/g DW on day 42, whereas plant weight decreased by day 49. The production of VAL and ACE was highest on day 28 (16.1 ± 1.7 and 5.2 ± 1.4 mg/g DW, respec-

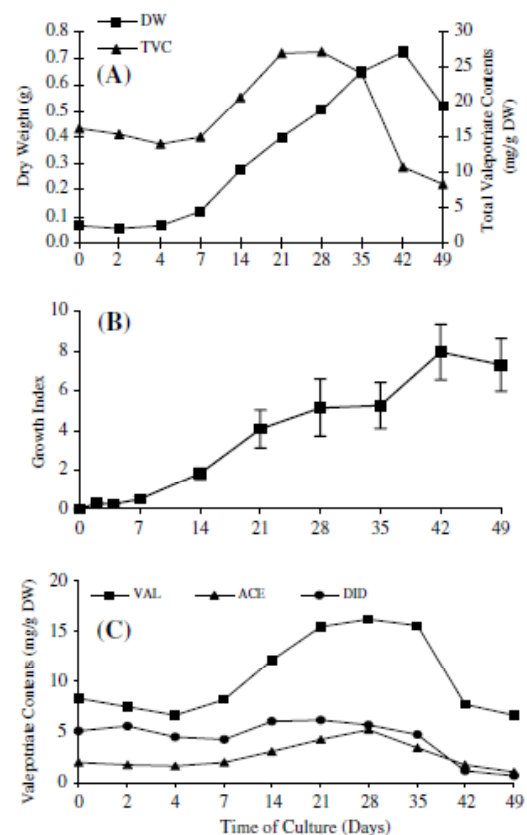


Fig. 3 Time-course study of growth and valepotriate production in plants of *V. glechomifolia* cultured in 1.0× MS liquid medium containing 3% sucrose. (A) Dry weight and total valepotriate contents (TVC), (B) Growth index (GI), (C) Individual valepotriate contents (mg/g DW). Values are means of four different experiments, bars = ± SD ($n = 15$)

tively), whereas DID concentration was highest on day 21 (6.2 ± 1.4 mg/g DW) (Fig. 3C).

Light is an important physical factor, which influences growth, development and the formation of primary and secondary metabolites (Rout et al. 2000). The analysis of *V. glechomifolia* growth in liquid culture under light and dark conditions showed that light-grown plants yielded higher GI by 21 days of culture, although equivalent GIs were seen later for the treatments (Fig. 4A); a similar increase in number of leaves throughout the culture period was observed both under light and dark conditions (Fig. 4B). Higher numbers of roots started to be observed after 28 days of growth in dark treatment (Fig. 4C).

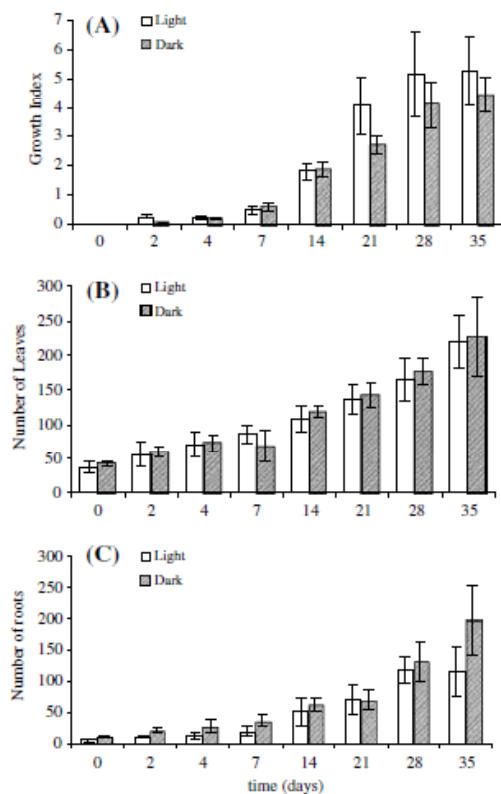


Fig. 4 Comparative growth of *V. glechomifolia* plants cultured in 1.0× MS medium under light ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and dark conditions. (A) Growth Index (B) Number of leaves and (C) Number of roots. Values are means of three different experiments \pm SD ($n = 15$)

After 14 days of culture, dark-grown plants started to show chlorosis, which was intensified toward the end of the incubation period; however, plants were still viable at the end of the experiments. The maximum valepotriate contents were observed after four ($27.2 \pm 5.9 \text{ mg/g DW}$) and five ($25.0 \pm 4.9 \text{ mg/g DW}$) weeks in the cultures growth under light and dark conditions, respectively (Fig. 5A, B, C and D). In both cases, the major valepotriate was valtrate and valepotriate contents were equivalent or higher than those reported for the intact plant of *V. glechomifolia* (Silva et al. 2002), with no significant difference in total valepotriate contents between light and dark-grown plants or in valepotriate release to the medium. In vitro callus and root differentiated tissue cultures of *V. officinalis*, *Centrathus ruber*

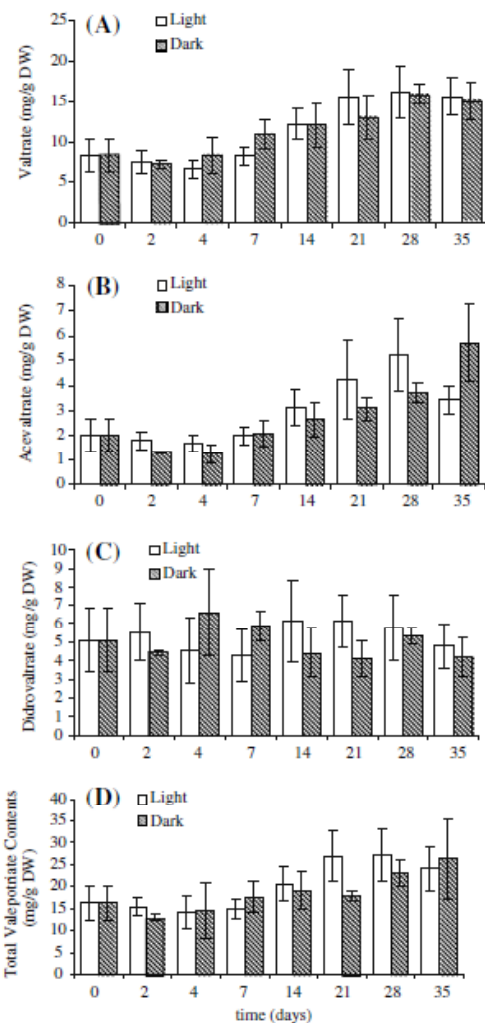


Fig. 5 Valepotriate yields (mg/g DW) accumulated by *V. glechomifolia* plants cultured in 1.0× MS medium under light ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and dark conditions. (A) Valtrate, (B) Acevaltrate, (C) Didrovaltrate, (D) Total valepotriate contents. Values are means of three different experiments \pm SD ($n = 15$)

and *C. macrosiphon* grown in continuous dark showed, in several cases, higher valepotriate contents than the roots of intact plants (Violon et al. 1984), indicating that light is not an indispensable physical condition for valepotriate formation. Similar results have been reported for valepotriate accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *V. glechomifolia* (Maurmann et al. 2006).

The limited effects of light and darkness on metabolite yield suggest that valepotriate production may rely on combined sources of isopentenyl pyrophosphate supplied by the mevalonate (MVA) and deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) pathways (Lange et al. 1999). Future studies should focus on the relative participation of these pathways in the biosynthesis of valepotriates.

Propagated *Valerianeae* have been shown to maintain stable valepotriate production comparable to or even higher than field-grown plants. Micropropagated *V. officinalis* plants showed less variation than seed propagated plants in contents of active constituents (Gao and Björk 2000). In another study performed with *V. edulis*, Castillo and co-workers (2002) showed that the contents of valepotriates from roots and rhizomes of *in vitro* regenerated plants were comparable to the same parts of wild plants in reproductive stage. Micropropagated plants of *V. glechomifolia* showed similar or higher contents of valepotriates compared to wild plants after three months of acclimatization (De Carvalho et al. 2004).

In conclusion, *V. glechomifolia* can be successfully propagated in liquid medium without growth regulators, and the system developed in this work can provide stable biomass and valepotriate production by whole-plant liquid culture. Valepotriate contents of liquid medium cultured plants were higher than those observed in field-grown plants. Considering the ease of medium adjuvant supply and uptake surface, and the control of environmental factors, this whole plant culture system can be useful to produce phytochemicals from *V. glechomifolia* and to study their metabolism.

Acknowledgements The authors are grateful to the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPERGS for financial support. We would also like to thank Prof. Dr. Pedro R. Petrovick (Faculdade de Farmácia, UFRGS) for lending the HPLC equipment.

References

- Backlund A, Moritz T (1998) Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. *Biochem Syst Ecol* 26:309–335
- Banerjee S, Rahman L, Uniyal GC, Ahuja PS (1998) Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy roots cultures of *Valeriana wallichii* DC. *Plant Sci* 131:203–208
- Bondarev N, Reshetnyak O, Nosov A (2003) Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. *Plant Sci* 165:845–850
- Bounthan C, Bergmann C, Beck JP, Haag-Berrurier M, Anton R (1981) Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Med* 41:21–28
- Bos R, Hendriks H, Scheffer JJC, Woerdenbag HJ (1998a) Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. *Phytomedicine* 5:219–225
- Bos R, Woerdenbag HJ, van Putten FMS, Hendriks H, Scheffer JC (1998b) Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Med* 64:143–147
- Castillo P, Zamilpa A, Márquez J, Hernández G, Lara M, Alvarez L (2002) Comparative study of differentiation levels and valepotriate content of *in vitro* cultures and regenerated and wild plants of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. *J Nat Prod* 65:573–575
- Chen Y-Q, Fei Y, Cai M, Lou J-X (2003) Effects of amino acids, nitrate, and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*. *Plant Growth Reg* 41:265–268
- De Carvalho CMB, Maurmann N, Luz DI, Fett-Neto AG, Rech SB (2004) Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Rep* 23:251–255
- Etienne H, Berthouly M (2001) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69:215–231
- Fuzzati N, Wolfender JL, Hostettmann K, Msonthi JD, Mavi S, Molleyres LP (1996) Isolation and antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the search for valepotriates in crude Valerianaceae extracts. *Phytochem Anal* 7:76–85
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158
- Gao XQ, Björk L (2000) Valerenic acids and valepotriates among individuals, varieties and species of *Valeriana*. *Fitoterapia* 71:19–24
- Gontier E, Clément A, Grivot TA, Lièvre A, Guckert F, Bourgaud F (2002) Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production. *Plant Sci* 163:723–732
- Gränicher F, Christen P, Kapetanidis I (1992) High-yield production of valepotriates by hairy roots cultures of *Valeriana officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan. *Plant Cell Rep* 11:339–342
- Herrera-Arellano A, Luna-Villegas G, Cuevas-Uriostegui ML, Alvarez L, Vargas-Pineda G, Zamilpa-Alvarez A, Tortoriello J (2001) Polysomnographic evaluation

- of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. *Planta Med* 67:695–699
- Houghton PJ (1999) The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *J Pharm Pharmacol* 51:505–512
- Kittipongpatana N, Davis DL, Porter JR (2002) Methyl jasmonate increases the production of valepotriates by transformed root cultures of *Valerianella locusta*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 71:65–75
- Lange BM, Croteau R (1999) Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: Cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* 365:170–174
- Liu CZ, Murch SJ, El-Demerdash M, Saxena PK (2004) *Artemisia judaica*: Micropropagation and antioxidant activity. *J Biotechnol* 110:63–71
- Liu CZ, Honda KH, Kobayashi T (2001) In situ regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus immobilized in polyurethane foam. *J Biosci Bioeng* 91:76–80
- Mathur J, Ahuja PS, Mathur A, Kukreja AK, Shah NC (1988) In vitro propagation of *Valeriana wallichii*. *Planta Med* 54:82–83
- Maurmann N, De Carvalho CMB, Silva AL, Fett-Neto AG, von Poser GL, Rech SB (2006) Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:50–53
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Murch SJ, Liu C, Romero R, Saxena PK (2003) In vitro culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 73:63–68
- Rout GR, Samantary S, Das P (2000) In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol Adv* 18:91–120
- Salles LA, Silva AL, Rech SB, Zanatta N, von Poser GL (2000) Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochem Syst Ecol* 28:907–910
- Salles LA, Silva AL, Fett-Neto AG, von Poser GL, Rech SB (2002) *Valeriana glechomifolia*: In vitro propagation and production of valepotriates. *Plant Sci* 163:165–168
- Silva AL, Rech SB, von Poser GL (2002) Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to south Brazil. *Planta Med* 68:570–572
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry*. W. H. Freeman, San Francisco
- Violon C, Dekegel D, Vercruyse A (1984) Relation between valepotriate content and differentiation level in various tissues of Valerianeae. *J Nat Prod* 47:934–940