

ELICITAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CUMESTANOS PELO CLONE 19 DE *Hairy roots* DE *Eclipta alba* Hassk COM ELICITORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

Gevaldo MACIEL¹; Miriam V. LOURENÇO²; Hagar C. C. C. MACIEL³

RESUMO

Devido aos efeitos tóxicos e cumulativos do uso contínuo de drogas sintéticas, a fitoterapia vem se tornando mais difundida. *Eclipta alba*, uma planta medicinal é usada como anti-hipertensiva, anti-tumoral, anti-hepatite C e ainda como um antídoto contra veneno de serpentes, porém produz quantidade limitada de substâncias para fins terapêuticos. Técnicas biotecnológicas como o uso de raízes em cabeleira e elicitação, incrementam a produção dessas substâncias de interesse. A curva de crescimento de biomassa dessa planta a partir do clone 19, nos informa que de 18 a 21 dias é o período ideal pra se fazer a estimulação de suas raízes com elicitores bióticos e abióticos. Partindo desse conhecimento busca-se aplicar os elicitores em estudo, com o intuito de avaliar e incrementar a produção de metabólitos secundários de interesse por *Eclipta alba*.

INTRODUÇÃO

O uso de compostos derivados de reservas naturais com propriedades terapêuticas é antigo (BONIFÁCIO, et al., 2014) e, ultimamente, um número crescente de pessoas tem buscado medicamentos à base de plantas isoladamente ou em combinação com outras drogas convencionais (PAN, SI-YUAN, et al., 2014), o que propiciou um aumento dos investimentos nessa área de estudo e, a nossa grande diversidade de fontes naturais (ALBUQUERQUE, U.P. et al., 2007) têm levado a identificação de metabólitos secundários valiosos. Porém substâncias que apresentam atividades biológicas estão geralmente nas plantas em quantidades muito pequenas (menos que 1% do seu peso seco) (RAO, S.R & RAVISHANKDAR, G.A., 2002). O uso de cultura de células vegetais representa então, uma ferramenta biotecnológica útil para aumentar a produção desses metabólitos valiosos e ainda com possibilidade de reduzir a produção de compostos tóxicos.

O desenvolvimento das técnicas de culturas de tecidos vegetais *in vitro*, possibilitou a produção de diferentes compostos independente das variações sazonais. Entre os processos de cultura de tecidos, a obtenção de plantas transgênicas de forma indireta por meio de um vetor biológico como o *Agrobacterium* também vem sendo muito utilizado (ARSHAD, W. et al., 2014).

A *Eclipta alba*, é uma planta da família *Asteraceae*, e é usada como atividade anti-hepatotóxica (KIM, D-I., LEE, S-H, HONG, J-H., 2010), apresenta atividades anti-oxidantes, antimicrobiana, antiinflamatória (CHIN-FENG, C. et al., 2014; RYU, S. et al., 2013 e TEWTRAKUL, S. et al., 2011), anti-tumoral (BENES, P., et al., 2011), e ainda um trabalho de (CARVALHO, B.M.A. et al., 2013; Diogo, L.C., et al., 2009) vem confirmar a sua eficiência na aplicação do extrato da planta como um antídoto contra veneno de serpentes. É nativa de países de clima tropical e subtropical como o Brasil, China, Índia, Tailândia e Austrália (CHIN-FENG, C. et al., 2014). Plantas transgênicas de *Eclipta alba* foram obtidas de forma indireta por serem feridas e infectadas por *Agrobacterium rhizogenes*, recebendo especificamente genes indutores de raízes (Ri), estratégia essa que, associada à elicitação por agentes bióticos e abióticos incrementaram a sua produção de metabólitos secundários de interesse.

Recentemente vários trabalhos tem demonstrado o uso de elicitores bióticos e abióticos no incremento na produção de metabólitos secundários interesse por várias plantas, porém em *Eclipta alba* não se tem relatos do emprego dessa estratégia.

MATERIAL E MÉTODOS

Em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foram inoculadas 2 g de raiz do C-19. As culturas foram mantidas sob agitação a 100 rpm, a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 x 8 horas. Os frascos de raízes foram coletados em intervalos de 3 dias, durante 42 dias e anotadas as suas massas fresca e seca. Foi plotada a curva de crescimento.

A elicitação biótica e abiótica foi efetuada usando respectivamente Extrato de Fungo 100 e 140 μM e Azacitidina 25 e 50 μM e foram realizadas no 21º dia de crescimento da cultura. Para os controles foram usados apenas o solvente de dissolução sem os elicitores. O experimento foi realizado em triplicata, e após os 4, 7 e 12 dias após a elicitação as raízes foram retiradas, pesadas, secas e, posteriormente foram feitas a extração e quantificação das substâncias de interesse nas amostras controle e elicitadas.

Para a extração o material seco foi moído e pesado e seus metabólitos extraídos com solventes metanol (MeOH) p. A. (Synth), sob ultrassom, por 30 minutos. Em seguida o material foi filtrado, sendo o metanol evaporado e os extratos secos foram ressuspensos em 1 mL de MeOH P.A. para a determinação da concentração de cumestanos de interesse por CLAE.

Para a detecção e quantificação dos cumestanos presentes nas raízes de *Eclipta alba*, 200mg de raízes (pó) foram adicionados 5ml de etanol 70%. A extração foi realizada em ultra-som durante 30 minutos. Em seguida as amostras foram quantificadas por HPLC. O volume de injeção foi de 20µL e o monitoramento realizado a 350nm. A quantificação foi feita através de padronização externa, usando uma curva de calibração de WL (Sigma- Aldrich) em concentrações de 0,063mg/L até 0,500mg/L. O tempo de retenção (Tr) para a Wedelolactona foi de 31 minutos e para Demetilwedelolactona foi de 26,881 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Usando as variáveis de 2g do inóculo, 50ml de meio de cultura e avaliação de condução da curva em 42 dias, a figura 1, abaixo, mostra que as raízes iniciaram a fase exponencial de crescimento após o 6º dia de cultivo e estendendo-se até o 18º dia, onde então o crescimento entrou na fase estacionária.

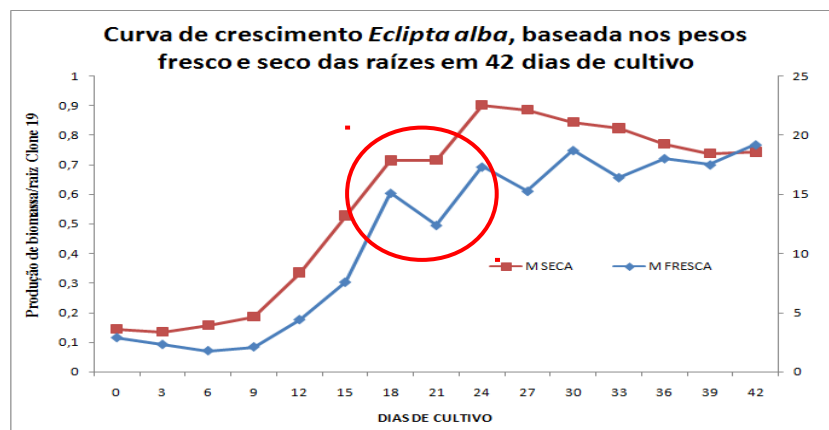


Figura 1 – Curva de crescimento da *Eclipta alba*, em 42 dias de cultivo.

As raízes apresentaram incremento de 5,6 vezes a quantidade de biomassa, quando comparados ao inóculo. Pelos resultados obtidos é possível inferir que o período entre o 18º e o 21º dias de crescimento é o mais adequado pra se fazer a adição dos agentes estimuladores, visto que os maiores acúmulos de metabólitos secundários são encontrados após o termino da fase exponencial de crescimento celular.

APANHADO GERAL DA ELICITAÇÃO

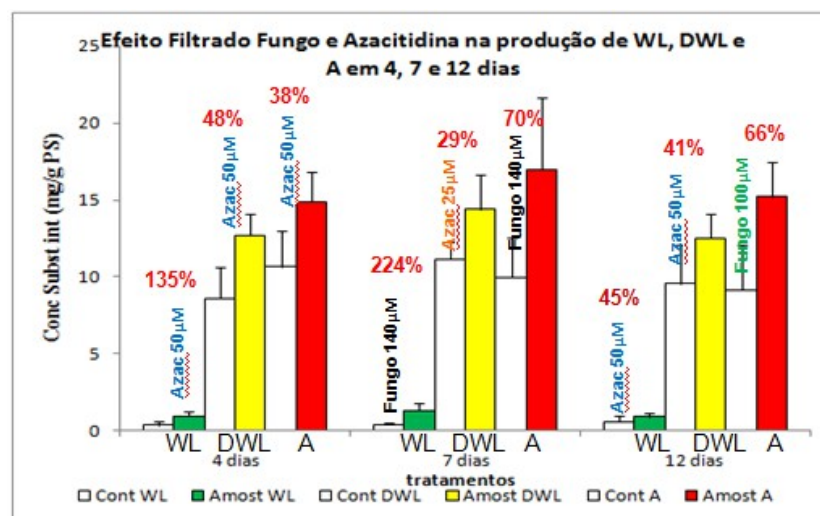


Figura 2 – Quantificação da produção média de WL, DWL e A em 4 e 7 dias, por raízes do C-19 a partir da elicitação (mg/g de raiz de *E. alba*)

Fonte: Elaborado pelo autor

Para as 3 substâncias (WL, DWL e LUT) nos 3 tempos avaliados (4, 7 e 12 dias) podemos verificar os seguintes resultados.

Em 4 dias o melhor elicitor para WL, DWL e A foi a Azacitidina 50µM produzindo uma porcentagem de incremento de 135%, 48 e 38% de incremento na produção das respectivas substâncias..

Em 7 dias o melhor elicitor para WL e A foi o Extrato de Fungo 140µM, com um incremento de 224 e 70% de incremento das respectivas substâncias e, para DWL o elicitor de melhor resposta foi a Azacitidina 25µM propiciando 29% de incremento na sua produção.

Para 12 dias o melhor elicitor para WL e DWL foi a azacitidina 50µM, com um incremento de 45 e 41% na quantidade das respectivas substâncias e para a substância A o melhor elicitor foi o Extrato de Fungo 100µM propiciando um incremento da produção de A de 66%.

CONCLUSÕES

A azacitidina 50µM poderia ser o elicitor ideal para ser aplicado em raízes secas de *Eclipta alba* pois produz efeito satisfatório no incremento de WL, DWL e A em 5 condições das 9 condições de elicitação estudadas; porém quando se fala o rendimento (produção de subst de interesse) o Extrato de Fungo 140µM torna-se mais indicado para produzir WL e A e a Azac 25µM para produzir DWL ;

Esses elicitores (Extrato de Fungo 140µM e Azac 25µM) mostraram-se mais eficiente quando as raízes são analisadas 7 dias após a elicitação (ao contrário de AJ e MJ) que mostraram melhor rendimento quando a análise foi efetuada em 4 e 12 dias, inferindo que diferentes elicitores provocam diferentes respostas de elicitação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAYNER, A. R. A.; MEDEIROS, C. B. Incorporação do tempo em SGBD orientado a objetos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCO DE DADOS, 9., 1994, São Paulo. Anais... São Paulo: USP, 1994. p. 16-29.

ALBUQUERQUE DE UP, DE MEDEIROS PM, DE ALMEIDA ALS, et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of ne brazil: a quantitative approach. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY. 114(3), 2007 p. 325–354,. [[pubmed](#)]

ARSHAD, [WAHEED](#),¹ [IHSAN-UL- HAQ](#),² [MOHAMMAD TAHIR WAHEED](#),¹ [KIRANKUMAR S. MYSORE](#),³ AND [BUSHRA MIRZA](#)^{1,*} .*Agrobacterium*-Mediated Transformation of Tomato with rolB Gene Results in Enhancement of Fruit Quality and Foliar Resistance against Fungal Pathogens. PLOS ONE. 9(5), 2014; e96979. Published online May 9, 2014. doi: [10.1371/journal.pone.0096979](#)

BENES P., KNOPFOVA L., TRCKA F., NEMAJEROVA A., PINHEIRO D., SOUCEK K., FOJTA M., SMARDA J. Inhibition of topoisomerase IIα: novel function of wedelolactone. CANCER LETT. v. 303, 2011. p. 29–38 [[PubMed](#)]

BRUNA VIDAL BONIFÁCIO, PATRICIA BENTO DA SILVA, MATHEUS APARECIDO DOS SANTOS RAMOS, KAMILA MARIA SILVEIRA NEGRI, TAÍS MARIA BAUAB, AND MARLUS CHORILLI. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. INT. J. NANOMEDICINE. v. 9, , 2014 p. 1-15.

CARVALHO, [B. M. A.](#), ¹ ,* [J. D. L. SANTOS](#), ² [B. M. XAVIER](#), ¹ [J. R. ALMEIDA](#), ³ [L. M. RESENDE](#), ³ [W. MARTINS](#), ¹ [S. MARCUSSI](#), ⁴ [S. MARANGONI](#), ³ [R. G. STÁBELI](#), ⁵ [L. A. CALDERON](#), ⁵ [A. M. SOARES](#), ⁵ [S. L. DA SILVA](#), ¹ AND [D. P. MARCHI-SALVADOR](#) ² . Snake Venom PLA2s Inhibitors Isolated from Brazilian Plants: Synthetic and Natural Molecules. BIOMED RES INT. 2013: 153045.

CHIN-FENG CHAN, WEN-YING HUANG, HONG-YI GUO, BO RONG WANG. CHRISTOPH ZUTZ ¹, AGNIESZKA GACEK ², MICHAEL SULYOK ³, MARTIN WAGNER ¹, JOSEPH STRAUSS ^{2,4} AND KATHRIN RYCHLI ^{1,*} Small Chemical Chromatin Effectors Alter Secondary Metabolite Production in *Aspergillus clavatus*. TOXINS. v. 5, 2014. p.1723-1741.

DIOGO, L.C.; FERNANDES, R.S.; MARCUSSI, S.; MANALDO, D.L.; ROBERTO, P.G.; MATRANGULO, P.V.F.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S. C.; GIULIATI, S.; DORAN, P.M. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. BIOTECHNOL. BIOENG, v. 103, 2009. p. 60 –76.

KIM D-I, LEE S-H, HONG J-H, et al. The butanol fraction of *Eclipta prostrata* (Linn) increases the formation of brain acetylcholine and decreases oxidative stress in the brain and serum of cesarean-derived rats. NUTRITION RESEARCH. 30(8), 2010. p. 579–584.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. PHYSIOL PLANT, v. 15(3), 1962. p. 473-497.

RAO SR, RAVISHANKAR GA. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. BIOTECHNOL ADV. v. 20, 2002. p. 101–53.

RYU S, SHIN JS, JUNG JY, et al. . Echinocystic acid isolated from *Eclipta prostrata* suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS, TNF- α , and IL-6 expressions via NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophages. PLANTA MEDICA. v. 79, 2013. p. 1031–1037.

[SI-YUAN PAN](#), 1 ,* [GERHARD LITSCHER](#), 2 ,* [SI-HUA GAO](#), 3 [SHU-FENG ZHOU](#), 4 [ZHI-LING YU](#), 5 [HOU-QI CHEN](#), 6 [SHUO-FENG ZHANG](#), 1 [MIN-KE TANG](#), 1 [JIAN-NING SUN](#), 1 AND [KAM-MING KO](#) 7. Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources. EVID BASED COMPLEMENT ALTERNAT MED. 2014.

TEWTRAKUL, S.; SUBHADHIRASAKUL, S.; TANSAKUL, P.; CHEENPRACHA, S.; KARALAI, C. Antiinflammatory constituents from *Eclipta prostrata* using RAW 264.7 Macrophage cells. PHYTOTHER. RES., v. 25, 2011. p. 1313–1316.