

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FENILPROPANÓIDES EM *Eclipta prostrata* (L) L.: AÇÃO DE
ELICITORES E COMPROVAÇÃO DA ROTA BIOSSINTÉTICA.

GIULIANA ROSANA DA SILVA SOUZA

RIBEIRÃO PRETO-SP

OUTUBRO-2020

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**FENILPROPANÓIDES EM *Eclipta alba*: AÇÃO DE ELICITORES E
COMPROVAÇÃO DA ROTA BIOSSINTÉTICA.**

GIULIANA ROSANA DA SILVA SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam V. Lourenço

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Aparecida Lopes

RIBEIRÃO PRETO-SP

OUTUBRO-2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP
- Universidade de Ribeirão Preto -

S729f Souza, Giuliana Rosana da Silva, 1995-
Fenilpropanóides em *eclipta prostrata* (L) 1.: ação de elicitores
e comprovação da rota biossintética / Giuliana Rosana da Silva
Souza. -- Ribeirão Preto, 2021.
37 f.: il. color.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Miriam V. Lourenço.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2021.

1. *Eclipta prostrata*. 2. *Hairy roots*. 3. Elicitores. 4. Cumestanos.
I. título.

CDD 660.6

GIULIANA ROSANA DA SILVA SOUZA

FENILPROPANÓIDES EM ECLIPTA ALBA: AÇÃO DE ELICITORES E
COMPROVAÇÃO DA ROTA BIOSINTÉTICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de
Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 29 de outubro de 2020

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Adriana Aparecida Lopes
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Prof. Dra. Milena Gaion Malosso
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Prof. Dra. Ana Maria Soares Pereira
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

RIBEIRÃO PRETO
2020

Quero dedicar este trabalho em memória ao meu pai que acompanhou toda minha jornada, mas não pôde acompanhar a minha finalização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo e por ter me sustentado até a finalização desta dissertação.

Á minha família que mesmo de longe me deu todo apoio e auxílio necessário.

Á minha orientadora Prof. Dr^a. Miriam e minha Coorientadora Prof, Dr^a. Adriana Lopes por todo auxílio, paciência e dedicação para comigo.

Aos meus amigos, professores Dra. Bianca e funcionários do laboratório Dra. Edieidia, Letícia, que me ajudaram nesta jornada, me auxiliando e orientando nas análises.

Á Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP por me acolher na realização deste curso.

Á CAPES pela bolsa a mim concebida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 <i>Eclipta prostrata</i> (L) L.....	2
2.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	3
2.3 MANIPULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR MEIO DE ELICITORES.....	5
2.4 AGENTES ELICITORES UTILIZADOS EM ESTUDO: METIL JASMONATO, ÁCIDO SALICÍLICO, EXTRATO DE LEVEDURA E HOMOGENATO DE PAREDE DO FUNGO <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	6
2.5 USO DE <i>Hairy roots</i> PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	7
2.6 BIOSÍNTESE.....	9
3. JUSTIFICATIVA	11
4 OBJETIVOS	12
4.1 OBJETIVO GERAL	12
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
5 MATERIAIS E MÉTODOS	13
5.1 MANUTENÇÃO <i>IN VITRO</i> DO CLONE 19 DE <i>Hairy roots</i> DE <i>E. prostrata</i>	13
5.2 ESTIMULAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE <i>Hairy roots</i> DE <i>Eclipta prostrata</i> PELA AÇÃO DE AGENTES ELICITORES.	13
5.2.1 PREPARO DOS AGENTES ELICITORES	13
5.2.2 ESTIMULAÇÃO DAS <i>Hairy roots</i> DE <i>E. prostrata</i> COM METIL JASMONATO (MJ) E ÁCIDO SALICÍLICO (AS).....	14
5.2.3 ESTIMULAÇÃO DAS <i>Hairy roots</i> DE <i>E. prostrata</i> COM E HOMOGENATO DE PAREDE (HP) DO FUNGO <i>L. pseudotheobromae</i> E EXTRATO DE LEVEDURA (EL)	14
5.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS FENILPROPANÓIDES ALVO	14
5.4 INCORPORAÇÃO DE 2- ¹³ C-ACETATO DE SÓDIO E 3- ¹³ C-FENILALANINA EM CULTURAS DE <i>Hairy roots</i> DE <i>E. prostrata</i>	15
5.4.1 ANÁLISES POR HPLC-MS/QTOF DOS EXTRATOS DAS MARCAÇÕES ISOTÓPICAS.....	15
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	16
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6.1 ESTIMULAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE <i>Hairy roots</i> DE <i>E. prostrata</i> PELA AÇÃO DE AGENTES ELICITORES.	17

6.1.1 ESTIMULAÇÃO DAS <i>Hairy roots</i> DE <i>E. prostrata</i> COM METIL JASMONATO.....	17
6.2 ESTIMULAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO EM <i>Hairy roots</i> DE <i>E. prostrata</i> COM ÁCIDO SALICÍLICO	21
6.3 ESTIMULAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO EM <i>Hairy roots</i> DE <i>E. prostrata</i> COM EXTRATO DE LEVEDURA	23
6.4 ESTIMULAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE <i>Hairy roots</i> DE <i>E. prostrata</i> APÓS ADIÇÃO DE HOMOGENATO DE PAREDE DO FUNGO <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	26
6.5 INCORPORAÇÃO DE 2- ¹³ C-ACETATO DE SÓDIO E 3- ¹³ C-FENILALANINA EM <i>Hairy roots</i> DE <i>E. prostrata</i>	29
CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 50 µM, 100 µM e 150µM de MJ após 4, 8 e 12 dias de adição.....	16
Tabela 2: Produção de Demetilwedelolactona (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 50 µM, 100 µM e 150µM de MJ após 4, 8 e 12 dias de adição.....	17
Tabela 3: Produção de Wedelolactona (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 50 µM, 100 µM e 150µM de MJ após 4, 8 e 12 dias de adição.....	18
Tabela 4: Produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 50 µM, 100 µM e 150µM de AS após 4, 8 e 12 dias de adição.....	19
Tabela 5: Produção de Demetilwedelolactona (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 50 µM, 100 µM e 150µM de AS após 4, 8 e 12 dias de adição.....	20
Tabela 6: Produção de Wedelolactona (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 50 µM, 100 µM e 150µM de AS após 4,8 e 12 dias de adição.....	21
Tabela 7: Produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 10 mg, 20 mg e 30 mg de Extrato de levedura após 4, 8 e 12 dias de adição.....	22
Tabela 8: Produção de Demetilwedelolactona (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 10 mg, 20 mg e 30 mg de Extrato de levedura após 4, 8 e 12 dias de adição.....	23
Tabela 9: Produção de Wedelolactona (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 10 mg, 20 mg e 30 mg de Extrato de levedura após 4, 8 e 12 dias de adição.....	24
Tabela 10: Produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 2,5 mg, 6,25 mg e 12,5 mg de Homogenato de parede do fungo <i>L. pseudotheobromae</i> após 4, 8 e 12 dias de adição.	25

Tabela 11: Produção de Demetilwedelolactona (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 2,5 mg, 6,25 mg e 12,5 mg de Homogenato de parede do fungo <i>L. pseudotheobromae</i> após 4, 8 e 12 dias de adição....	27
Tabela 12: Produção de Wedelolactona (mg/g PS) em <i>hairy roots</i> do Clone 19 de <i>Eclipta prostrata</i> controle e tratadas com 2,5 mg, 6,25 mg e 12,5 mg de Homogenato de parede do fungo <i>L. pseudotheobromae</i> após 4, 8 e 12 dias de adição.....	27
Tabela 13: Experimentos de marcação isotópica utilizando 2- ¹³ C-acetato de sódio e 3- ¹³ C-fenilalanina nas raízes de <i>E. prostrata</i>	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Eclipta prostrata</i> (L) L.....	2
Figura 2: Estruturas químicas de wedelolactona (1) demetilwedelolactona (2).....	4
Figura 3: Estrutura química do ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3,5-diCQA).....	5
Figura 4: Teste de regressão polinomial da produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3,5-diCQA) por <i>hairy roots</i> de <i>E. prostrata</i> 8 dias após estimulação com MJ.....	16
Figura 5: Teste de regressão polinomial da produção de Demetilwedelolactona por <i>hairy roots</i> de <i>E. prostrata</i> 8 dias após estimulação com Ácido Salicílico.....	20
Figura 6: Teste de regressão polinomial da produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico por <i>hairy roots</i> de <i>E. prostrata</i> 4 dias após estimulação com Extrato de Levedura.....	23
Figura 7: Teste de regressão polinomial da produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico por <i>hairy roots</i> de <i>E. prostrata</i> 4 dias após estimulação com Homogenato de parede do fungo <i>L. pseudotheobromae</i>	26
Figura 8: Estrutura da Wedelolactona (1), Demetilwedelolactona (2) e do ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3).....	29
Figura 9: Espectros de massas dos experimentos de marcação isotópica para a Wedelolactona (1) (Massa molar = 314,246). Espectro a= controle, Espectro b= 2- ¹³ C-acetato de sódio, Espectro c= 3- ¹³ C-fenilalanina.....	30
Figura 10: Espectros de massas dos experimentos de marcação isotópica para a Demetilwedelolactona (2) (Massa molar= 300,219). Espectro a= controle, Espectro a1= controle (ampliação), Espectro b= 2- ¹³ C-acetato de sódio, Espectro c= 3- ¹³ C-fenilalanina.....	31
Figura 11: Espectros de massas dos experimentos de marcação isotópica para o ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3) (massa molar 515,443). Espectro a= controle, Espectro b= 3- ¹³ C-fenilalanina.....	32
Figura 12: Biossíntese de wedelolactona (1), demetilwedelolactona (2) e ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3) após incorporação de 2- ¹³ C-acetato de sódio (vermelho) e 3- ¹³ C-fenilalanina (azul) nas raízes de <i>E. alba</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS

(3,5-diCQA) - Ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico.

AS - Ácido salicílico.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

DWL - Demetilwedelolactona.

EL - Extrato de levedura.

HP - Homogenato de parede.

MJ - Metil jasmonato.

MS – Meio de Murashige Skoog (1962).

WL – Wedelolactona.

RESUMO

Eclipta prostrata é uma planta medicinal, da família Asteraceae, que apresenta diversas propriedades farmacológicas, tais como antiofídica, antihepatotóxica e anticâncer, atribuídas aos cumestanos e flavonoides presentes na mesma. A interação de plantas com o *Agrobacterium rhizogenes* dão origem à raízes em cabeleira ou *hairy roots* e estas são amplamente utilizadas em estudos relacionados ao metabolismo secundário vegetal. O uso de *hairy roots*, associado ou não à adição de elicitores nas culturas, tem se tornado uma ferramenta importante no estabelecimento de sistemas de produção de moléculas farmacologicamente ativas. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de elicitores sobre a produção de fenilpropanóides, por *hairy roots* de *E. prostrata*. Para isso, culturas de *hairy roots* mantidas *in vitro* em meio MS líquido, receberam diferentes concentrações (50, 100 ou 150 μM) dos elicitores metil jasmonato (MJ) e ácido salicílico (AS), além de extrato de levedura (EL) (10, 20 ou 30 mg/100 mL) e homogenato de parede (HP) do fungo *Lasioidiplocia pseudotheobromae* (2,5; 6,25 ou 12,5 mg/100 mL). As culturas foram coletadas 4, 8, e 12 dias após a adição dos agentes, quando então foram secas em estufa e submetidas a extração dos metabólitos alvo. A quantificação dos metabólitos alvo (wedelolactona - WL, demetilwedelolactona - DWL e ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico- 3,5-diCQA) presentes nos extratos foi realizada por HPLC. As análises quantitativas possibilitaram verificar que a adição de MJ, EL e HP nas culturas de *hairy roots* de *E. prostrata* promoveu efeito principalmente sobre a produção do ácido 3,5-diCQA. Através de análises de regressão polinomial as concentrações ideais a serem adicionadas são de 92,62 μM de MJ, 17,69 mg de EL e 8,82 mg de HP. Já elicitador AS estimulou mais a produção do cumestano DWL, sendo determinado através de regressão polinomial que a concentração ótima deverá ser 62,13 μM . No entanto, para o cumestano WL os elicitores utilizados não causaram efeitos sobre a produção. O uso dos precursores marcados 2- ^{13}C -acetato de sódio e 3- ^{13}C -fenilalanina comprovaram que a via metabólica operante do 3,5-diCQA é a do chiquimato, enquanto que dos cumestanos WL e DWL é a via do acetato. Além disso a intensidade de marcação sugere que DWL é precursora da WL. Esse estudo proporcionou resultados que possibilitam a determinação de sistemas de produção dos compostos 3,5-diCQA e DWL a partir de *hairy roots* de *E. prostrata* utilizando elicitores específicos para cada composto isoladamente.

Palavras chaves: *Eclipta prostrata*. *Hairy roots*. Elicitores. Cumestanos. Ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3,5-diCQA).

ABSTRACT

Eclipta prostrata is a medicinal plant, from the Asteraceae family, which has several pharmacological properties, such as anti-phallic, anti-hepatotoxic and anticancer, attributed to the cumestans and flavonoids present in it. The interaction of plants with *Agrobacterium rhizogenes* give rise to roots in hair or hairy roots and these are widely used in studies related to secondary plant metabolism. The use of hairy roots, associated or not with the addition of elicitors in cultures, has become an important tool in the establishment of systems for the production of pharmacologically active molecules. Thus, this work aimed to evaluate the effect of elicitors on the production of phenylpropanoids, by hairy roots of *E. prostrata*. For this, hairy roots cultures maintained in vitro in liquid MS medium, received different concentrations (50, 100 or 150 μ M) of the elicitors methyl jasmonate (MJ) and salicylic acid (AS), in addition to yeast extract (EL) (10, 20 or 30 mg / 100 mL) and wall homogenate (HP) of the fungus *Lasioidiplocia pseudotheobromae* (2.5, 6.25 or 12.5 mg / 100 mL). The cultures were collected 4, 8, and 12 days after the addition of the agents, when they were then dried in an oven and subjected to extraction of the target metabolites. The quantification of the target metabolites (wedelolactone - WL, demethylwedelolactone - DWL and 3,5-Di-O-caffeoylquinico-3,5-diCQA) present in the extracts was performed by HPLC. Quantitative analyzes made it possible to verify that the addition of MJ, EL and HP in the hairy roots cultures of *E. prostrata* promoted an effect mainly on the production of 3,5-diCQA acid. Through polynomial regression analyzes the ideal concentrations to be added are 92.62 μ M MJ, 17.69 mg EL and 8.82 mg HP. Elicitor AS, on the other hand, stimulated the production of cumestane DWL more, being determined through polynomial regression that the optimum concentration should be 62.13 μ M. However, for cumestano WL the elicitors used did not have any effect on production. The use of precursors labeled 2-¹³C-sodium acetate and 3-¹³C-phenylalanine proved that the operative metabolic pathway of 3,5-diCQA is that of chiquimate, whereas that of cumestans WL and DWL is the acetate pathway. In addition, the intensity of marking suggests that DWL is a precursor to WL. This study provided results that enable the determination of production systems for 3,5-diCQA and DWL compounds from hairy roots of *E. prostrata* using specific elicitors for each compound alone.

Keywords: *Eclipta prostrata*. Hairy roots. Elicitors. Coumestans. 3,5-Di-O-caffeoylquinico acid (3,5-diCQA).

1 INTRODUÇÃO

Devido ao grande potencial na produção de metabólitos bioativos, as plantas medicinais são fontes importantes na descoberta e princípios de novos fármacos (VINAGRE et al., 2019). *Eclipta prostrata* produz metabólitos importantes e com propriedades farmacológicas distintas. Dentre os compostos produzidos por *E. prostrata* os cumestanos wedelolactona (WL) e demetilwedelolactona são as substâncias mais estudadas devido as suas atividades biológicas, principalmente anti-hepatotóxica e antitumoral. Além dos cumestanos o ácido 3,5-Di-O-cafeoylquinico (3,5-diCQA), derivado do ácido clorogênico, foi isolado de *E. prostrata* e mostra-se um composto muito promissor, pois apresenta atividades antioxidantes, antibiose, anti-inflamatória, antiviral e também antitumoral (SALMA et al, 2018; GONG et al, 2018).

Técnicas biotecnológicas tais como, cultura de células e tecidos vegetais, clonagem e melhoramento de plantas para uso em escala industrial, transformação genética e o uso de elicitores são algumas das estratégias de processos de produção de compostos biologicamente ativos (ISAH, 2019; CONTRELLAS et al, 2019).

O conhecimento das rotas biossintéticas presentes nas plantas possibilitam a manipulação do metabolismo secundário podendo intensificar a produção dos compostos de interesse. Assim, nesse trabalho, o uso de técnicas biotecnológicas aliadas a comprovação das rotas biossintéticas dos compostos alvo permitiram o entendimento da produção dos compostos pelas *hairy roots* de *E. prostrata*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Eclipta prostrata* (L) L.

Eclipta prostrata (L) L. Hassk, (sinônimo de *Eclipta prostrata*) é uma planta herbácea anual, pertencente à família Asteraceae. O seu gênero é derivado da palavra grega “ekleipta”, tendo como significado “deficiente”, mostrando sua ausência de cerdas, enquanto “alba” significa “branco”, devido a cor de sua flor. Entretanto, atualmente foram identificadas plantas de *E. prostrata* com outras cores, tais como: vermelho, amarelo, branco e azul. Morfologicamente, esta planta apresenta-se reta ou prostrada com ramificação em nós. As folhas possuem o formato de lanças opostas e sem caule. A origem de suas raízes é geralmente de pontos nodais grossos e suas flores são pequenas (KHURSHID et al, 2018).

Esta espécie possui ampla distribuição devido a sua fácil propagação, abrangendo Índia, China, Nepal e Brasil (GUPTA et al., 2017). *E. prostrata* apresenta diversos nomes populares, tais como, falsa margarida (XU et al., 2014), agrião do brejo, erva botão, erva lanceta, surucuína, coacica e tangeracá (Figura 1).

O uso efetivo na medicina tradicional, é feito pelas plantas com flores nas cores branco e amarelo. No entanto, a espécie branca é a mais frequentemente colhida por suas atividades terapêuticas, sendo estas, relacionadas principalmente ao fígado e cabelo (YADAV et al., 2017).

Figura 1: *Eclipta prostrata* (L) L.



Fonte: <https://www.vix.com/pt/bdm/medicina-alternativa/1133/eclipta-alba-a-erva-daninha-que-cura>.

2.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA

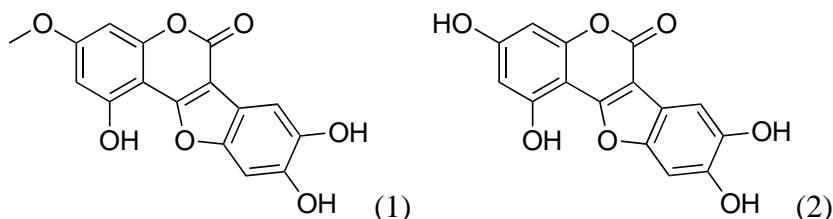
E. prostrata, é caracterizada como planta medicinal por ser constituída por diversas atividades biológicas, sendo empregada como um medicamento tradicional. Entre as propriedades existentes de *E. prostrata* se encontram sua atividade contra lepra, asma, bronquite, doenças inflamatórias, agente hepatoprotetor (ARYA et al., 2015), fins antivirais, antivenenos (geralmente veneno de serpente) (DIOGO et al., 2009), ação contra mosquitos e agente repelente de insetos (CHERUVU et al., 2018).

Na literatura foi relatado que em diferentes partes de *E. prostrata* há específicas propriedades medicinais. Suas raízes possuem efeito laxante, sendo utilizadas também como antissépticos na cicatrização de úlceras e feridas em animais. Enquanto que o líquido espremido de seus brotos possui atividade antibacteriana, anti-inflamatória, sendo mencionado ainda como medicamento para contração brônquica e antinociceptivo. Além disso, os seus constituintes fazem parte da composição de um medicamento cardioprotetor conhecido como Abana® (Himalaya) (KHURSHID et al, 2018).

Manvar et al., (2012), descreveu também sobre a atividade de *E. prostrata* contra o vírus da hepatite C, demonstrando eficácia no tratamento do mesmo. Em um outro estudo realizado por Govindarajan e Karuppanan (2011) os extratos das folhas de *E. prostrata* foram utilizados para investigação de suas atividades larvicida e ovicida contra o vetor da dengue, o mosquito *A. aegypti*, demonstrando potencial para seu controle. Compostos como os cumestanos wedelolactona, demetilwedelolactona e flavonóides luteolina, produzidos por *E. prostrata*, são descritos por possuírem atividade antitumoral (Figura 2) (LIU et al., 2017; ARYA et al., 2015).

De acordo com Cheruvu et al (2018), o cumestano, wedelolactona (1, 8, 9-trihidroxi-3-metoxi-6H-benzofuro [3, 2- c] cromen-6-ona), os flavonóides luteolina (3', 4', 5, 7-tetrahidroxiflavona) e apigenina (4', 5, 7-trihidroxiflavona) são os constituintes polifenólicos bioativos principais em *E. prostrata*.

Figura 2: Estruturas químicas de wedelolactona (1) demetilwedelolactona (2).

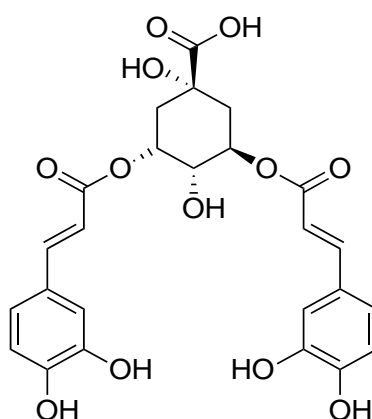


Além destes, foram encontrados ainda em *E. prostrata* os compostos quercetina, terpenóides, compostos voláteis, poliactilenos e alcaloides, todos esses compostos foram identificados na parte aérea de *E. prostrata* (GUENNÉ et al., 2019).

Entre tantas substâncias mencionadas em *E. prostrata*, o composto derivado de ácido clorogênico (CGA) o ácido 3,5-Di-O-cafeoylquinico (3,5-diCQA), é mais uma das substancia relatas. Pertencente ao grupo de polifenóis este componente possui atividades antioxidantes, antibiose, antiinflamatória, antiviral e atividades antitumorais (figura 3) (GONG et al., 2018; HONG et al., 2015).

E. prostrata mostra-se importante para o tratamento de diversas enfermidades. Por isso, estudos sobre o aumento de seus metabólitos secundários se tornam estratégias significativas para o estabelecimento do aumento da produção de seus compostos.

Figura 3: Estrutura química do ácido 3,5-Di-O-cafeoylquinico (3,5-diCQA).



2.3 MANIPULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR MEIO DE ELICITORES

Na natureza a produção de diferentes compostos farmacológicos pelas plantas ocorre como consequência a distintas condições ambientais, como seca, estresse osmótico, mudanças na temperatura, ataque por patógenos, dentre outros. Cultura de tecidos e células vegetais *in vitro* tem sido utilizada como ferramenta para estudos e produção de compostos farmacologicamente ativos (FUMAGALI et al, 2008). De forma semelhante à natureza, nas culturas *in vitro* a produção destes compostos acontecem em quantidades pequenas, por isso o uso de agentes elicitores permitem aumentos nessas produções. Esta estimulação do metabolismo secundário pode ser feita através do uso de elicitores bióticos ou abióticos (CONTRERAS et al, 2019).

Elicitores são definidos como substâncias de ocorrência natural ou sintética que inicia ou intensifica a biossíntese de metabólitos específicos quando introduzidos na cultura em determinadas concentrações (MENDONZA et al., 2018; LEE et al., 2013). Eles podem ser de origem biótica ou abiótica, estimulando reações diferentes de acordo com seu tipo, concentração, tempo de exposição e via biossintética alvo.

Elicitores bióticos são geralmente de origem patogênica, ou ainda, originados de compostos presentes nas vias de defesa vegetal, como por exemplo o ácido salicílico (AS) e compostos derivados da via dos jasmonatos, como o metil jasmonato (MJ) e ácido jasmônico (JA), incluindo, enzimas, fragmentos de parede celular de micro-organismos, polissacarídeos derivados de micro-organismos (quitina ou glucanos) ou plantas (pectina e celulose), além de glicoproteínas (MATTOS-JÚNIOR et al., 2010).

Elicitores abióticos são utilizados em menor frequência quando comparados com os bióticos, sendo os mesmos de origem não biológica. A natureza química e física podem ser as causas do estresse abiótico. Dentre os químicos estão sais inorgânicos, metais pesados e alguns agentes que interferem na integridade da membrana; dentre os fatores físicos estão ferimentos mecânicos, irradiação ultravioleta, alta salinidade, alta ou baixa osmolaridade, temperatura extrema (congelamento, descongelamento) e alta pressão. Estes métodos ativam o sistema de defesa bioquímico das plantas o que gera mudanças quantitativas e qualitativas na composição destes metabólitos (GAUME et al. 2003; ANGELOVA e GEORGIEV, 2006).

Os elicitores agem como sinalizadores de estresse, ativando vias metabólicas de defesa da planta, fazendo com que a mesma produza essas substâncias em maiores

quantidades. Sabe-se, que a estimulação de metabólitos secundários por elicitores tanto abióticos quanto bióticos causam muitas vezes a produção de fitoalexinas. A produção de metabólitos secundários por elicitores é iniciada quando um padrão associado a patógenos (PAMP) ou efector microbiano liga-se a um receptor de reconhecimento específico na membrana plasmática. O qual desencadeia a sinalização, por exemplo, da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) ou fosfolipase e resulta na expressão de fatores de transcrição (TFs) que acionam diretamente a transcrição de genes da via biossintética, resultando na produção desses compostos (FARRELL et al, 2017).

O emprego de elicitores no aumento da produção de metabólitos secundários vegetais é um método que tem gerado muitos resultados positivos. Por isso, o seu uso se torna uma estratégia significativa quando se tem interesse na produção de maiores teores de substâncias com alto valor farmacológico em plantas medicinais (CAI et al., 2012).

2.4 AGENTES ELICITORES UTILIZADOS EM ESTUDO: METIL JASMONATO, ÁCIDO SALICÍLICO, EXTRATO DE LEVEDURA E HOMOGENATO DE PAREDE DO FUNGO *Lasiodiplodia pseudotheobromae*

Jasmonato é uma classe de hormônios vegetais que desempenham o papel de sinalizadores específicos na planta para a ativação de processos fisiológicos no decorrer de seu desenvolvimento. A biossíntese dessa classe de hormônios ativam respostas de defesa induzidas por ataque e ferimentos de patógenos (GUNJEGAONKAR & SHANMUGARAJAN, 2019).

MJ em particular, foi descrito por exercer um papel importante na sinalização de processos que regulam genes de defesa em plantas. A sua aplicação em diferentes culturas de células vegetais ativam vias biossintéticas secundárias que conseqüentemente acarretam em um aumento da produção de várias classes de metabólitos secundários, tais como terpenóides, flavonóides, alcalóides e fenilpropanóides (ESTRADA et al., 2016).

Assim como MJ, o AS é um hormônio vegetal que participa do sistema regulador de defesa em plantas, sendo caracterizado por induzir resistência adquirida sistêmica (SAR) a diversos patógenos. No momento da interação com patógeno a resposta de hipersensibilidade é desencadeada pelo rápido acúmulo de AS no local da infecção. Este sinal é enviado para outras partes da planta, sendo capaz de promover a indução de suas respostas de defesas, fazendo com que ocorra a produção de algumas classes de metabólitos secundários (ESTRADA et al 2016).

Estes dois agentes elicitores são descritos em diversos trabalhos pela sua eficácia quanto ao aumento da produção de compostos. Em estudo realizado por Guan et al., (2019) a concentração de 10 μM de MJ foi suficiente para o aumento do conteúdo fenólico, tendo em média 34, 8% a mais do composto fenólico em brócolis. Ionkova (2009), utilizou este agente elicitador em diferentes concentrações (50-200 μM) e em seu estudo foi comprovado sua ação quando manuseado na concentração de 150 μM no aumento de ariltetralina lignanas em *hairy roots* de *L. tauricum*.

Lee et al., (2013) em outro estudo utilizando *Aloe vera* (Asphodeloideae), relatou que o uso de elicitores endógenos causou efeitos na via biossintética de poliacetilenos do tipo III, onde Aloe emodin e crisofanol tiveram suas produções aumentadas em consequência ao uso de AS como elicitador.

Além destes agentes elicitores, o extrato de levedura e o homogenato de parede do fungo *L.pseudotheobromae* são relatados também em alguns trabalhos quanto a sua indução de metabólitos secundários. Ahmed & Baig (2014) mostraram em seu estudo que o uso de 1,5% v/v de extrato de levedura para a produção de psoraleno em culturas de suspensão de células de *psoralea corylifolia* proporcionou o aumento de 4,1 vezes do composto. Ali et al., (2018) utilizou extrato de levedura para o aumento da produção de compostos fenólicos em gengibre, resultando em um acréscimo de 1,4 vezes.

Apesar de o homogenato de parede do fungo *L.pseudotheobromae* não ser muito evidenciado quanto ao seu potencial elicitador, este fungo é um agente patogênico que causa infecções em videiras, sendo este também um fungo produtor de ácido jasmônico, o que consequentemente propicia o seu uso na indução do aumento de compostos secundários (DISSANAYAKE et., 2015).

2.5 USO DE *Hairy roots* PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Estratégias para intensificar a produção de metabólitos secundários que apresentem grande potencialidade no uso como ingredientes cosméticos, nutracêuticos, aditivos alimentares e produtos farmacêuticos tem sido alvo de muitos trabalhos (CAI et al., 2012).

Vários são os métodos utilizados para o aumento desta produção. No entanto, o uso da tecnologia de transformação genética tem se tornado uma estratégia eficiente para o aumento da produção de compostos biologicamente ativos, utilizando-se de

metodologias de inserção direta ou indireta de genes no genoma vegetal (BROOHAERTS et al., 2005).

A Transformação genética de plantas, é uma técnica que possibilita o melhoramento vegetal pela obtenção de genótipos com novas características, podendo garantir resistência a praga, tolerância a herbicidas, aumento de produção de biomassa ou de metabólitos secundários, esterilidade, dentre outros (GUIMARÃES et al., 2003). A transformação genética de plantas através do vetor *Agrobacterium rhizogenes* gera o fenótipo conhecido como *hairy roots*, que são raízes com intenso crescimento (FOLGADO et al., 2019).

O uso de *hairy roots* na produção de metabólitos secundários vegetais é importante, pois o acúmulo dos metabólitos pode ocorrer tanto no interior das raízes quanto serem excretados para o meio de cultura. Alguns trabalhos relatam o acúmulo destes compostos em meio de cultura, como em *hairy roots* de *Glycyrrhiza uralensis*, acumulando 98 e 94% de licochalcona e flavonóides (CAI et al, 2012).

Em um trabalho realizado por Ansari et al (2019), eles avaliaram a produção de compostos polifenólicos por *hairy roots* de *Ligularia fischeri* e, em seus resultados foram obtidos o acúmulo de seis ácidos hidroxicinâmicos, sete flavonóis, sete ácidos hidroxibenzóicos, vanilina, resveratrol, pirogalol, homogentísico e ácidos verátricos, sendo encontradas maiores concentrações destes, em raízes transformadas quando comparados às raízes da planta.

Em estudos com *Brassica oleraceae* também foi evidenciado maior produção de glucosinolatos em *hairy roots*, quando comparados à raízes da planta mãe (CUONG et al, 2019).

O uso de *hairy roots* na produção de metabólitos secundários, é uma estratégia importante para o aumento da produção de metabólitos secundários vegetais, principalmente em grande escala, ainda mais quando a mesma é utilizada em conjunto com outros métodos, o que resulta em produção acentuada de compostos alvos. Isso pode ser comprovado em estudos com *Calendula officinalis*, onde foi obtido um aumento de produção de 8,5 vezes mais saponina pelas *hairy roots* em conjunto com o uso de elicitores abióticos (ALSOUFI et al, 2019).

2.6 BIOSSÍNTESE

Existe uma grande diversidade de metabólitos secundários, sendo identificados mais de 50 mil em espécies de angiospermas, sintetizados em distintos compartimentos celulares por meio de quatro vias biossintéticas, são elas: via do ácido mevalônico (MEV), via do acetato malonato, do metileritritol fosfato (MEP) e via do ácido chiquímico. Estas vias formam os três principais grupos de metabólitos secundários: substâncias fenólicas, terpenos e substâncias nitrogenadas (PENA et al., 2016).

A via do MEV é uma via metabólica que direciona diversos processos celulares, incluindo a biossíntese do colesterol, isoprenóides e a prenilação pós-tradução de proteínas. Esta via é alvo farmacológico das estatinas e bifosfonatos, medicamentos para o tratamento de hipercolesterolemia (PERRALES et al., 2017; XIA et al., 2018).

A via do acetato malonato é a via que produz compostos com estruturas moleculares que possuem anéis aromáticos. Na sua primeira etapa a acetil-CoA liga-se a anidrido carbônico para a formação de malonil-CoA, que conseqüentemente reage com outra molécula de acetil-CoA que resulta em acetimalonil-CoA. A descarboxilação desta molécula produz acetoacetil-CoA. Logo, a formação de poliacetilenos é conduzida a sucessiva condensações de acetoacetil-CoA e malonil-CoA seguidamente com a perda de dióxido de carbono e hidrólise dos distintos poli- β -ceto ésteres. A condensação intramolecular dos policetídeos que é conseqüência da atividade dos grupos metilenos proporcionam a biossíntese de produtos fenólicos identificados como acetogeninas, são eles: ácidos benzóicos (C6-C1), acetofenonas (C6-C2), cromanos (C6-C3) e quinonas (JUNIOR, 2002, BRUCKNER et al., 2020).

A formação de monoterpênos (C10), diterpênos (C20) e tetraterpênos (C40) são originados da via do MEP, ocorrendo nos plastídeos, sendo piruvato e gliceraldeído-3-fosfato os precursores (OOTANI et al., 2013)

As três substâncias presentes em *E. prostrata* são derivadas da via do ácido chiquímico, cuja via é formada a partir do processo regenerativo do carboidrato eritrose-4-fosfato, sintetizado no momento fotossintético, além do derivado da glicose, o fosfoenolpiruvato. Estes dois componentes, dão início a via que através das reações de condensação e muitas reações transformadoras, formam a via do ácido chiquímico (CZELUSNIAK et al., 2012). Na literatura não foram encontrados trabalhos descritos sobre a via biossintética dos cumestanos. No entanto, para os derivados de ácido clorogênico a via prevista para esses compostos já havia sido relatada, onde o autor

descreve que a atividade destes compostos são controlados pela via de fenilpropanoides e pela via do chiquimato (MAHESH et al., 2007).

A importância de se conhecer as rotas biossintéticas de compostos está no favorecimento da manipulação do metabolismo permitindo uma maior produção de compostos em particular. Assim, a aplicação de métodos biotecnológicos bem como a compreensão da via biossintética se tornam estratégias eficazes de modo a permitir o estabelecimento e otimização de condições específicas do aumento de produção de compostos alvos.

3. JUSTIFICATIVA

A busca por sistemas de produção contínuos de metabólitos secundários farmacologicamente ativos e valiosos é uma vertente da biotecnologia. O uso de bioprocessos, baseado no sistema de *hairy roots*, pode ser uma alternativa adequada se a produtividade das culturas for economicamente viável, visto que esse sistema tende a ter uma maior produtividade dos compostos produzidos quando comparados às raízes da planta mãe. O uso dessas culturas aliadas a adição de elicitores pode proporcionar um aumento na produtividade, possibilitando o estabelecimento de um sistema de produção controlado de compostos de interesse biológico. É importante ainda conhecer a rota biossintética dos compostos de interesse, pois isso permitirá a manipulação do metabolismo de uma forma a favorecer uma maior produção de compostos em particular. Assim, a utilização de elicitores em cultura de *hairy roots* de *E. prostrata* aliado à compreensão das rotas biossintéticas das substâncias alvo WL, DWL e 3,5-diCQA poderá auxiliar no estabelecimento de um sistema de produção contínuo e controlado desses compostos. Além disso, permitirá estabelecer e otimizar condições específicas de aumento de produção de cada composto em particular.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação de elicitores sobre a produção de fenilpropanóides em cultura de *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. e, comprovar a rota biossintética.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito dos elicitores Metil Jasmonato, ácido salicílico, extrato de levedura e homogenato de parede do fungo *L.pseudotheobromae* sobre a produção de fenilpropanóides em plântulas e *hairy roots* de *E. prostrata*;
- Definir o melhor agente elicitor do metabolismo secundário em culturas de *E. prostrata*;
- Definir a melhor concentração e tempo de exposição para a estimulação da produção dos metabólitos secundários em culturas de *hairy roots* e plântulas de *E. prostrata*;
- Comprovar a rota biossintética dos fenilpropanóides em *E. alba*, através da adição de precursores marcados isotopicamente (2-¹³C-acetato de sódio e 3-¹³C-fenilalanina) nas culturas de *hairy roots*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MANUTENÇÃO *IN VITRO* DO CLONE 19 DE *Hairy roots* DE *E. prostrata*

As *Hairy roots* foram obtidas por Diogo et al., (2009) e seu cultivo vem sendo mantido, sob condições assépticas, em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) líquido, no escuro, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e sob agitação constante a 100 rpm, subcultivados a cada 30 dias. Nesse estudo foi utilizado o clone 19, por apresentar maior produção dos cumestanos *in vitro*.

5.2 ESTIMULAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE *Hairy roots* DE *Eclipta prostrata* PELA AÇÃO DE AGENTES ELICITORES.

Foram utilizados como agentes elicitores Metil Jasmonato (MJ -392707-Sigma), Ácido Salicílico (AS 247588– Sigma-Aldrich), Extrato de levedura e homogenato de parede (HP) do fungo filamentosso *Lasiodiplodia pseudtheobromae*.

5.2.1 PREPARO DOS AGENTES ELICITORES

Soluções mãe dos agentes elicitores foram preparadas como segue:

MJ: solução 0,05 M em etanol seguido de esterilização através de membrana esterilizante $0,22\mu\text{m}$ (Millex).

AS: solução 0,05 M em água seguido de esterilização por autoclavagem a $121^{\circ}\text{C}/15$ minutos.

EL: solução a 10,0 mg/mL em água seguido de esterilização por autoclavagem a $121^{\circ}\text{C}/15$ minutos.

HP: após crescimento da linhagem CBMAI 1982 de *L. pseudotheobromae* em meio M2 líquido por 7 dias, a cultura foi filtrada a vácuo e o micélio coletado e seco em estufa de ar circulante a 40°C por 48 horas. Em seguida o micélio foi pulverizado com auxílio de um almofariz até pó fino e, então ressuspenso em água destilada deionizada (2,5% m/v) e posteriormente esterilizado por autoclavagem a $121^{\circ}\text{C}/15$ minutos.

5.2.2 ESTIMULAÇÃO DAS *Hairy roots* DE *E. prostrata* COM METIL JASMONATO (MJ) E ÁCIDO SALICÍLICO (AS)

Em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura MS líquido, foram inoculadas 1,0 g de *hairy roots* do Clone 19. As raízes foram mantidas em agitação a 100 rpm, a $25\pm 2^\circ$ C e no escuro, para seu crescimento. No 21º dia de cultivo à cada frasco de cultura foi adicionado o elicitor. Para MJ e AS foram adicionados volumes da solução a 0,05M de forma a conter as concentrações de 50 μ M, 100 μ M ou 150 μ M de cada agente elicitor, separadamente. Como controle positivo os frascos receberam volumes equivalentes do solvente respectivo (etanol para MJ e água para AS). Os experimentos foram realizados em triplicata e as coletas feitas 4, 8 e 12 dias após a adição dos agentes elicitores.

Após as coletas as raízes foram submetidas à pesagem para a determinação da massa fresca e então, para a determinação da massa seca, as mesmas foram mantidas em estufa com ar circulante a 45° C durante 48 horas. Todos os materiais secos foram então submetidos à extração e quantificação dos metabólitos alvo produzidos.

5.2.3 ESTIMULAÇÃO DAS *Hairy roots* DE *E. prostrata* COM E HOMOGENATO DE PAREDE (HP) DO FUNGO *L. pseudotheobromae* E EXTRATO DE LEVEDURA (EL)

As culturas de *hairy roots* foram mantidas semelhante a descrição feita no item 5.2.2 e no 21º dia de cultivo receberam as suspensões do homogenato do fungo ou o extrato de levedura. Para a estimulação com HP foram adicionados volumes de 100 μ L, 250 μ L ou 500 μ L da suspensão mãe em cada frasco de cultura, correspondendo respectivamente a 2,5 mg, 6,25 e 12,5 mg em cada cultura. Para a estimulação com EL foram adicionados 100 μ L, 200 μ L ou 300 μ L correspondendo a 10 mg, 20 mg e 30 mg por cultura. Os experimentos foram realizados em triplicata e as coletas feitas com 4, 8 e 12 dias após a adição dos agentes elicitores. Os pesos fresco e seco das raízes foram determinados conforme citado no item 5.2.2 assim como as extrações e quantificações dos metabólitos alvo.

5.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS FENILPROPANÓIDES ALVO

Os materiais secos foram pulverizados com auxílio de um almofariz e então submetidos à extração. De cada amostra foram pesados 200 mg e adicionados 5mL de metanol:água (7:3) e a mistura mantida em ultrassom por 30 minutos. O material foi coletado

com auxílio de uma seringa e em seguida 1,0 mL do extrato foi filtrado em membranas de nylon de 0,45 μ m (GVS) e transferido para vials de 1,0 mL, para posterior quantificação das substâncias de interesse.

A quantificação dos compostos alvo presentes nos extratos foi realizada num Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) de marca SHIMADZU modelo LC-10-ADVP equipado com um auto injetor SIL-10AF, detector de arranjo de fotodiodo (SPD-M20A), sob controle do programa CLASS-VP, tendo sido utilizado uma coluna Kinetex-Phenomenex (Torrance, CA, EUA) (250 x 4,6 mm id; tamanho de partícula 5 μ m). O sistema solvente utilizado nas análises foi ácido acético em água 0,1% (A) e metanol (B). As análises foram realizadas num gradiente linear indo de 10% de B em A até 66% de B em 32 minutos, retornando a 10% de B em A até 35 minutos, terminando a análise aos 40 minutos. O volume de injeção foi de 20 μ L e o monitoramento realizado a 350 nm. A quantificação foi feita através de padronização externa, usando uma curva de calibração de WL (W4016, Sigma-Aldrich) em concentrações de 0,063 mg/mL até 0,500 mg/mL.

5.4 INCORPORAÇÃO DE 2-¹³C-ACETATO DE SÓDIO E 3-¹³C-FENILALANINA EM CULTURAS DE *Hairy roots* DE *E. prostrata*

Para os experimentos de incorporação dos precursores marcados o 2-¹³C-acetato de sódio foi solubilizado em água ultrapura e a 3-¹³C-fenilalanina foi preparada com uma mistura de água ultrapura e Dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção 8:2.

Raízes com cerca de 1 mês foram transferidas para meio MS basal líquido contendo 30g/L de sacarose, pH ajustado em 6,0 (\pm 0,05) e suplementado com 2-¹³C-acetato (0,25%) ou 3-¹³C-fenilalanina (10 mM). Uma cultura controle (isenta de precursor) também foi preparada. Para cada tratamento foram feitas 6 replicatas (n=6). As culturas de raízes foram mantidas à 25°C \pm 2°C, no escuro e sob agitação de 100 rpm durante 10 dias (55-60% de umidade relativa). Após os 10 dias de cultivo, as raízes foram coletadas e submetidas à extração utilizando metanol.

5.4.1 ANÁLISES POR HPLC-MS/QTOF DOS EXTRATOS DAS MARCAÇÕES ISOTÓPICAS

As condições analíticas utilizadas foram as mesmas usadas nas análises quantitativas (item 5.3). O equipamento utilizado foi um sistema HPLC (Shimadzu)

composto por sistema de bombeamento de solvente LC-20AD, degaseificador DGU-20A, auto-injetor SIL-20AHT, detector com arranjo de fotodiodo SPD-M20A, forno para coluna CTO-20A e módulo de comunicação CBM-20A acoplado a um espectrômetro de massas com uma fonte de ionização eletrospray e um analisador micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics).

As análises foram realizadas na FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP sob a colaboração do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à ANOVA sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. As variáveis DW com 4 dias e CQA com 12 dias foram submetidas à transformação logarítmica para atender ao pressuposto de normalidade da análise paramétrica, mas para facilitar o entendimento, são apresentadas as médias não transformadas. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTIMULAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE *Hairy roots* DE *E. prostrata* PELA AÇÃO DE AGENTES ELICITORES.

6.1.1 ESTIMULAÇÃO DAS *Hairy roots* DE *E. prostrata* COM METIL JASMONATO

Dentre os compostos produzidos pelas *hairy roots* de *E. prostrata*, nos detemos em analisar a produção do ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3,5-di-CQA), da demetilwedelolactona (DWL) e da wedelolactona (WL) por se tratarem de compostos majoritários (3,5-di-CQA e DWL) nos extratos e/ou de grande importância farmacológica (WL).

A adição de MJ às culturas de *hairy roots* de *E. prostrata* promoveu estímulo na produção do 3,5-di-CQA em todos os tempos de exposição e concentrações do agente elicitor adicionado (Tabela 1). Considerando-se a concentração de MJ adicionada, os aumentos na produção do composto após 4 dias de exposição ao agente foram de 2,2, 2,3 e 2,2 vezes para 50µM, 100 µM e 150µM. Nas culturas coletadas após 8 dias de exposição os aumentos nos teores de 3,5-di-CQA produzidos pelas raízes tratadas com MJ foram de 2,6, 2,5 e 2,2 vezes os teores produzidos pelas raízes controles. Aumentos semelhantes foram observados nas raízes coletadas 12 dias após a adição do agente. É possível observar ainda na Tabela 1 que, o aumento na produção do 3,5-di-CQA não foi proporcional ao aumento da concentração de MJ adicionado. Além disso, quando analisamos as raízes que receberam a maior dose do agente elicitor, percebemos uma redução no teor de 3,5-di-CQA quando comparado às menores doses de MJ adicionadas, sugerindo uma possível toxicidade do agente às raízes quando em concentrações superiores a 100 µM. Este resultado é similar ao obtido por Kim et al (2004), porém em culturas de plantas de *Centella asiatica* (L.), onde concentrações superiores a 100 µM obtiveram efeito negativo sobre o aumento do composto em análise, relatando ser 100 µM a dosagem ideal para a indução do aumento de asiaticosídeo. Em um outro estudo dosagens de 50 e 100 µM mostraram-se suficientes para o aumento de triterpenóides em *hairy roots* de *Centella asiatica* (L.), obtendo resultados semelhantes apesar de serem concentrações diferentes (NGUYEN et al., 2019).

O tempo de exposição ao MJ foi mais positivo sobre a produção do composto alvo do que a concentração do agente elicitor. O aumento nos teores de 3,5-di-CQA produzidos pelas raízes em função do tempo de cultivo, mesmo nas raízes controle, é

esperado e, isso é devido ao estágio de desenvolvimento das culturas que se encontram em fase estacionária de crescimento, portanto em alta atividade de metabolismo secundário (HUANG et al., 2014).

Os resultados obtidos com 8 e 12 dias de cultivo não obtiveram diferenças estatísticas significativas e considerando a produtividade em relação ao tempo, quando as concentrações são semelhantes, compensa sua retirada em menos dias. Por isso, foi realizado o teste de regressão com 8 dias após a adição do agente elicitor. Este teste tem por objetivo identificar a dose que promova a maior produção do composto alvo.

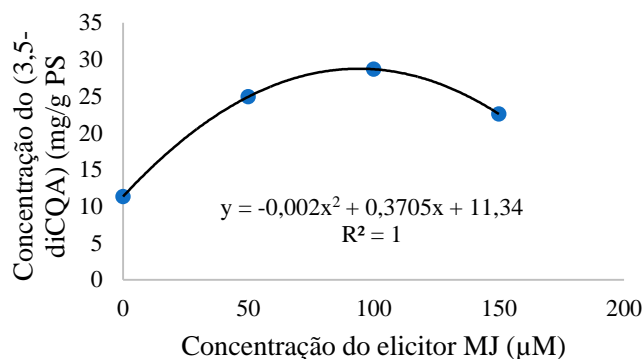
Tabela 1: Produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (mg/g PS) em *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 50 µM, 100 µM ou 150µM de MJ após 4, 8 e 12 dias de exposição.

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (DIAS)		
	4	8	12
Controle	7,96bB	10,62cA	12,67cA
50 µM	17,63aB	27,18aA	27,09aA
100 µM	18,50aB	26,46aA	28,77aA
150 µM	17,46aB	23,33bA	24,30bA

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Por meio da equação ($y = -0,002x^2 + 0,3705x + 11,34$) dada através da regressão polinomial (Figura 2), foi possível estimar que a concentração ideal de MJ a ser adicionada às culturas visando um maior estímulo na produção de 3,5-di-CQA será 92,62µM de MJ e a coleta 8 dias após a adição.

Figura 4: Teste de regressão polinomial da produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3,5-diCQA) por *hairy roots* de *E. prostrata* 8 dias após estimulação com MJ.



Analisando os resultados do efeito da adição de MJ sobre a produção do cumestano DWL, pelas *hairy roots* verificamos que os aumentos na produção de DWL estatisticamente significativos ocorreram somente nos tempos de exposição de 8 e 12 dias. Com 8 dias de exposição MJ foi capaz de estimular a produção de DWL em média 1,5 vezes, enquanto que com 12 dias de exposição nas concentrações de 50 μM e 100 μM os aumentos foram de 2,7 e 2,1 vezes respectivamente (Tabela 2).

O teste de regressão polinomial não foi realizado nesse experimento, pois ao comparar os resultados em relação aos tempos de exposição (4, 8 e 12 dias) e as concentrações (50, 100 e 150 μM) utilizadas, não foram verificadas mudanças estatisticamente significativas que justificassem a realização do mesmo.

Tabela 2: Produção de Demetilwedelolactona (mg/g PS) em *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 50 μM , 100 μM ou 150 μM de MJ após 4, 8 e 12 dias de exposição.

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	2,61aA	3,10bA	2,65bA
50 μM	4,85aA	4,66aA	7,15aA
100 μM	4,42aA	5,31aA	5,72aA
150 μM	5,68aA	4,84aA	4,17bA

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Analisando os resultados de produção de WL verificamos um efeito significativo do agente MJ somente após 12 dias de exposição em todas as concentrações analisadas

(50, 100 e 150 μM) principalmente na concentração de 100 μM quando comparado ao controle (Tabela 3) tendo um aumento de 5,5 vezes. Isso pode ser devido ao menor teor de WL presente no controle nesse tempo de exposição (0,15 mg/gPS) quando comparado aos demais controles que apresentaram em média 0,38 mg/g PS (Tabela 3).

Tabela 3: Produção de Wedelolactona (mg/g PS) em *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 50 μM , 100 μM ou 150 μM de MJ após 4, 8 e 12 dias de exposição.

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	0,39aA	0,38aA	0,15bB
50 μM	0,68aA	0,33aA	0,58aA
100 μM	0,84aA	0,62aA	0,82aA
150 μM	1,21aA	0,66aA	0,67aA

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O MJ é um agente que tem o potencial de estimular a produção de diversas classes de metabólitos secundários em diferentes espécies vegetais, um exemplo foi o estudo realizado por Faizal & Sari em *hairy roots* de ginseng Javanese (*Talinum paniculatum*) onde MJ foi capaz de estimular a produção de saponinas em 1,5 vezes.

Sharan et al (2019), obtiveram aumento na produção de ácido ursólico e eugenol em *hairy roots* de *Ocimum tenuiflorum* L. estimuladas tanto com MJ, como ácido salicílico e extrato de levedura. O estudo possibilitou verificar uma relação entre a concentração do agente elicitador, o tempo de exposição e a idade da cultura sobre a resposta ao estímulo, de forma que um aumento ou uma inibição pode ocorrer quando se varia esses parâmetros. No estudo, os três agentes utilizados promoveram acréscimos distintos, extrato de levedura mostrou-se eficiente principalmente no aumento eugenol (6,0 vezes a mais que o controle na concentração de 50 mg/L com 8 dias de exposição), enquanto que metil jasmonato proporcionou principalmente o aumento de ácido ursólico (5,0 vezes maior que o controle na concentração 60 mg/L com 8 dias de exposição) assim como ácido salicílico (3,0 vezes em comparação ao controle na concentração de 30 mg/L com 4 dias de exposição).

Os agentes elicitores proporcionam respostas específicas em plantas, de acordo com o metabólito de interesse. Essas diferenças quanto ao aumento na produção de metabólitos secundários em decorrência do uso de elicitores, são devidas tanto ao tipo como a concentração do agente utilizado. Além disso, cada agente pode atuar sobre mecanismos de ação diferentes para produzir o efeito desejado ou até mesmo não serem capazes de promover respostas na defesa da planta (NARAYANI & SRIVASTAVA, 2017).

6.2 ESTIMULAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO EM *Hairy roots* DE *E. prostrata* COM ÁCIDO SALICÍLICO

Na tabela 4 estão apresentados os teores de 3,5-di-CQA produzidos pelas *hairy roots* durante o experimento de estimulação por AS. É possível verificar que o AS foi capaz de estimular a produção do 3,5-di-CQA somente na presença de 50 μM de AS com 4 dias de exposição. Nesse tratamento o aumento da concentração de 3,5-diCQA foi 1,2 vezes quando comparado ao respectivo controle.

Tabela 4: Produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (mg/g PS) em *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 50 μM , 100 μM e 150 μM de Ácido Salicílico após 4, 8 e 12 dias de exposição.

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	9,50bB	12,39aA	13,36aA
50 μM	11,78aA	14,00aA	12,93aA
100 μM	10,02bB	10,31aB	13,37aA
150 μM	7,85cA	12,60aA	12,58aA

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Com relação à produção do cumestano DWL, o uso de AS somente mostrou efeito elicitor quando esse foi adicionado na concentração de 50 μM , sendo as respostas com 8 e 12 dias de exposição superiores à de 4 dias (Tabela 5). As razões de aumento de produção de DWL na presença de 50 μM de AS foram respectivamente de 1,1; 2,1 e 1,6 vezes quando comparado aos respectivos controles. Além disso, quando o AS foi adicionado em concentrações superiores (100 e 150 μM), na maioria dos tratamentos

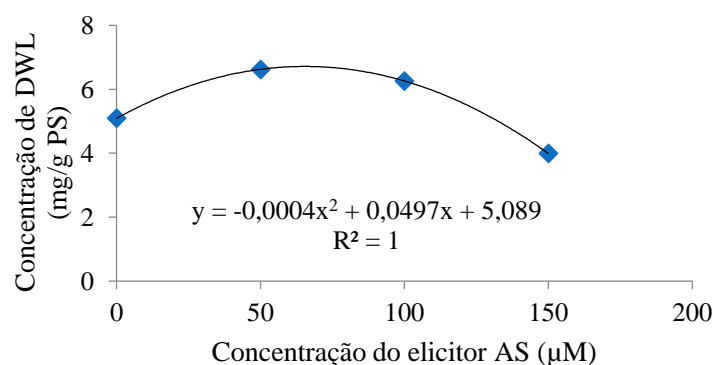
houve efeito inibitório sobre a produção de DWL, evidenciando uma possível toxicidade do composto às raízes. Assim, os melhores tratamentos foram obtidos pela adição de 50µM de AS e mantidos por tempos de exposição de 8 e 12 dias, não havendo diferenças estatísticas entre os dois tempos. Desta forma aplicou-se o teste de regressão polinomial com 8 dias de exposição, sendo a dose de AS mais adequada para o estímulo na produção de DWL pelas *hairy roots* de *E. prostrata* a de 62,13 µM (Figura 3).

Tabela 5: Produção de Demetilwedelolactona (mg/g PS) em *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 50 µM, 100 µM e 150µM de Ácido Salicílico após 4, 8 e 12 dias de exposição.

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	4,56bA	4,32bA	5,14bA
50 µM	5,11aB	8,91aA	8,01aA
100 µM	4,14bB	3,97bB	3,29cA
150 µM	2,60cA	4,75bA	6,54aA

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Figura 5: Teste de regressão polinomial da produção de Demetilwedelolactona por *hairy roots* de *E. prostrata* 8 dias após estimulação com Ácido Salicílico.



Quando ao efeito da adição do agente AS sobre a produção de WL pelas *hairy roots* de *E. prostrata*, é possível verificar na Tabela 6, que em nenhum dos tratamentos realizados houve estímulo na produção de WL pelas raízes quando comparado aos controles.

Tabela 6: Produção de Wedelolactona (mg/g PS) em *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M de Ácido Salicílico após 4,8 e 12 dias de exposição.

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	0,97aA	0,80aA	0,74aA
50 μ M	1,26aA	1,05aA	0,68aA
100 μ M	1,53aA	0,64aB	0,75aB
150 μ M	0,54aB	0,99aA	0,64aB

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em estudos realizados por Wang et al (2017) foram avaliados o uso de diferentes agentes elicitores sobre a produção de acteosídeos em *hairy roots* de *Rehmannia glutinosa*, e os melhores resultados foram obtidos com o uso de AS. De forma semelhante, Faizal & Sari estudaram o efeito de MJ e AS sobre *hairy roots* de *Talinum paniculatum* quanto à produção de saponinas e verificaram que o AS foi capaz de intensificar 1,3 vezes a produção desta classe de compostos.

Apesar de AS ser um dos responsáveis das respostas de defesas em plantas, em *hairy roots* de *E. prostrata* esse agente foi capaz de induzir aumento na produção de 3,5-di-CQA e do cumestano DWL somente na menor concentração testada

6.3 ESTIMULAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO EM *Hairy roots* DE *E. prostrata* COM EXTRATO DE LEVEDURA

A adição de EL, como agente elicitor do metabolismo secundário em *hairy roots* de *E. alba*, apresentou efeito positivo somente sobre a produção de 3,5-di-CQA. *Hairy roots* colhidas 4 dias após as estimulações apresentaram aumentos nos teores de 3,5-di-CQA produzidos de 1,5; 1,3 e 1,3 vezes, respectivamente para as concentrações de 10 mg, 20 mg e 30 mg de EL. De forma semelhante as *hairy roots* colhidas após 12 dias de exposição apresentaram aumento na produção do 3,5-di-CQA também em todas as concentrações de EL adicionadas, mas com razões de aumentos um pouco superiores 1,6, 1,7 e 1,9 vezes quando comparados ao controle (Tabela 7). Análises estatísticas comprovaram o efeito do EL sobre as *hairy roots*, mas esta não é dose dependente, ou

seja, os aumentos nas concentrações de 3,5-di-CQA produzidos não foram proporcionais aos aumentos da concentração de EL adicionados.

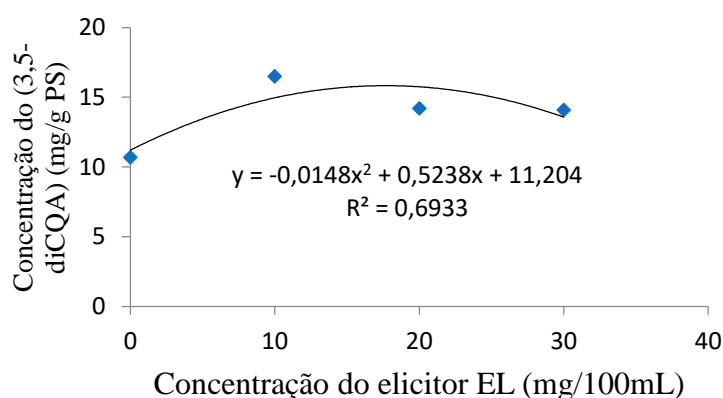
Tabela 7: Produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (mg/g PS) em *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 10 mg, 20 mg e 30 mg de Extrato de levedura após 4, 8 e 12 dias de exposição.

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	10,69bA	12,43aA	9,4bA
10 mg	16,50aA	14,05aA	15,49aA
20 mg	14,21aA	15,38aA	15,73aA
30 mg	14,09aA	15,89aA	17,77aA

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Considerando o efeito elicitor do EL sobre a produção do 3,5-di-CQA, foi aplicado o teste de regressão polinomial, evidenciando que a concentração ótima de EL a ser adicionada às culturas para se obter maior produção do composto pelas *hairy roots* deverá ser 17,69 mg de cultura, com período de incubação de 4 dias (Figura 4).

Figura 6: Teste de regressão polinomial da produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico por *hairy roots* de *E. prostrata* 4 dias após estimulação com Extrato de Levedura.



Considerando as produções dos cumestanos DWL e WL pela *hairy roots* de *E. prostrata* após as adições de EL às culturas, não foram observados efeitos positivos do agente elicitor (Tabela 8 e 9).

Tabela 8: Produção de Demetilwedelolactona (mg/g PS) em *hairy roots* do Clone 19 de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 10 mg, 20 mg e 30 mg de Extrato de levedura após 4, 8 e 12 dias de adição

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	7,17aA	10,47aA	11,08aA
10 mg	7,79aA	8,86aA	9,99aA
20 mg	6,66aA	8,46aA	6,79bA
30 mg	5,72aB	8,53aA	9,36aA

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 9: Produção de Wedelolactona (mg/g PS) em *hairy roots* do Clone 19 de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas 10 mg, 20 mg e 30 mg de Extrato de levedura após 4, 8 e 12 dias de adição

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	1,16aA	1,67aA	1,87aA
10 mg	1,03aA	3,41aA	1,94aA
20 mg	1,01aA	1,09aA	1,11aA
30 mg	1,25aB	0,92aB	2,03aA

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

De forma geral, dentre os compostos elicitores utilizados, O aumento da produção de ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3,5-diCQA), foi favorável na utilização dos elicitores MJ e EL, porém em dias distintos. O maior estímulo para o 3,5-diCQA, foi visto quando elicitado com MJ.

O benefício desses dois elicitores (MJ e EL) também foram observados por Li, et al (2015), em *hairy roots* de *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib, quando introduzidas a estas 200 µM de MJ e 200 µL de EL, o qual proporcionaram tanto crescimento quanto a produção de tanshinona em suas culturas. MJ aumentou o conteúdo de tanshinone IIA 1,99 vezes quando comparado com o controle, enquanto que o EL promoveu o acúmulo de massa seca e do teor de criptotanshinona.

Em um outro estudo realizado por Zlotek (2017), foi avaliado o efeito do extrato de levedura sobre a produção de compostos bioativos em manjerona. Em seus estudos não houveram diferenças significativas ao controle quanto a produção de compostos fenólicos. No entanto, os efeitos do uso de extrato de levedura foram observados no aumento do teor de ácido ascórbico em folhas de manjerona e da atividade antioxidante.

Os elicitores bióticos por serem de origem biológica possuem uma composição complexa e incerta. O extrato de levedura é conhecido por sua melhoria na produção de composto, tais como camptotecina, plumbagin, andrographolide, ácido rosmarínico, escopolamina e cardenolídeo. Como exemplo tem-se os ácidos fenólicos, ácido rosmarínico e ácido litospermico B, em culturas de *hairy roots* de *Salvia miltiorrhiza* que obtiveram um aumento de 1,3 e 0,2 vezes nas suas produções, além de um aumento de 95 vezes no conteúdo intracelular de criptotranshinona pela ação do EL (DEEPTHI e SATHEESHKUMAR, 2015; NARAYANI e SRIVASTAVA, 2017).

6.4 ESTIMULAÇÃO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE *Hairy roots* DE *E. prostrata* APÓS ADIÇÃO DE HOMOGENATO DE PAREDE DO FUNGO *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

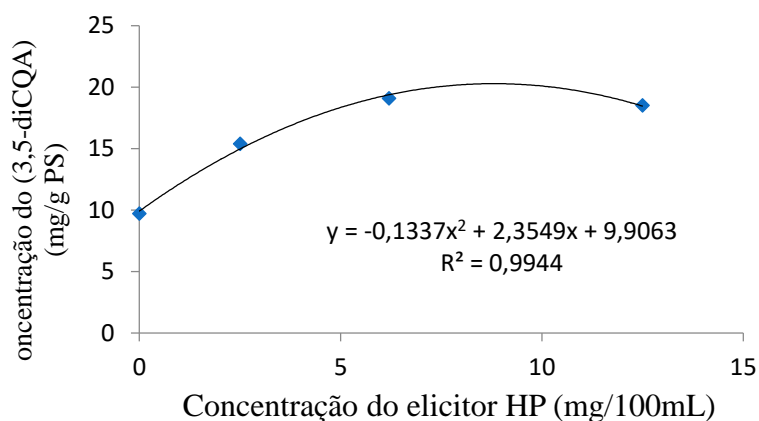
O uso de homogenato de parede (HP) do fungo *L. pseudotheobromae* proporcionou aumentos na produção do 3,5-diCQA em todas as condições ensaiadas. As respostas de elicitação foram dose dependente e, os maiores estímulos aconteceram nas culturas mantidas por 4 ou 8 dias de contato com elicitador (Tabela 10). Embora o tratamento 6,25 mg de HP durante 12 dias de exposição tenha apresentado a maior razão de estímulo (2,5 vezes), os tratamentos pelo período de 4 dias de exposição podem ser considerados os que apresentaram melhores respostas, visto o menor período de elicitação, onde as razões de aumentos foram de 1,6, 1,9 e 2,0 vezes a concentração do 3,5-diCQA para os tratamentos com 2,5 mg, 6,25 mg e 12,5 mg respectivamente. Por não ter ocorrido diferença estatística entre os dias de cultivo estabelecidos (4, 8 e 12 dias), o teste de regressão polinomial foi realizado com 4 dias, obtendo 8,82 mg como concentração prevista de HP para o aumento de produção do composto 3,5-diCQA.

Tabela 10: Produção de ácido 3,5-Di-O-cafeoylquinico (mg/g PS) em *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 2,5 mg, 6,25 mg ou 12,5 mg de homogenato de parede do fungo *L. pseudotheobromae* após 4, 8 e 12 dias de exposição.

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	9,72cA	10,52cA	7,39cB
2,5 mg	15,39bA	15,30bA	11,90bB
6,25 mg	18,50aA	18,92aA	18,35aA
12,5 mg	19,09aA	17,95aA	11,85bB

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Figura 7: Teste de regressão polinomial da produção de ácido 3,5-Di-O-cafeoylquinico por *hairy roots* de *E. prostrata* 4 dias após estimulação com Homogenato de parede do fungo *L. pseudotheobromae*.



A adição do HP sobre as *hairy roots* de *E. prostrata* visando a produção de DWL apresentaram aumentos nas produções nas dose 2,5 e 6,25 mg de HP, e o tempo de exposição não aprsentou efeito sobre o estímulo (Tabela 11). De forma geral, a adição de 2,5 mg de HP/100 mL de cultura com conseqüente manutenção de 4 dias de exposição são suficientes para estimular a produção de DWL pelas *hairy roots* de *E. alba*.

A maior dose utilizada (12,5 mg de HP) apresentou efeito inibidor sobre a produção de DWL, possivelmente por efeito tóxico do agente. Esse resultado evidencia a

importância da concentração do agente elicitor sobre o metabolismo secundário vegetal. Resultado semelhante foi obtido em estudos com culturas de células em suspensão de *Psolareia corylifolia* L. onde a utilização de *Aspergillus niger*, como agente elicitor, na concentração de 1,0% (v/v) promoveu um aumento de 9 vezes da concentração do composto psoraleno em análise e sua consequente diminuição na produção quando utilizado concentrações do elicitor superiores a 1,0% (v/v) (AHMED & BAIG, 2014).

Tabela 11: Produção de Demetilwedelolactona (mg/g PS) em *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 2,5 mg, 6,25 mg e 12,5 mg de Homogenato de parede do fungo *L. pseudotheobromae* após 4, 8 e 12 dias de exposição.

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	9,48bA	8,90bA	8,92bA
2,5 mg	12,02aA	9,94aA	10,40aA
6,25 mg	10,87aA	10,81aA	10,41aA
12,5 mg	8,88bA	8,52bA	7,07cB

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A produção de WL pelas *hairy roots* de *E. prostrata* acontece sempre em menores quantidades quando comparada com 3,5-diCQA e DWL, visto serem as partes aéreas o órgão de maior produção de WL (Diogo, 2010), e as respostas aos elicitores sobre sua produção também tem sido inferiores. Na tabela 12 estão apresentados os teores de WL nos tratamentos realizados com HP, sendo possível observar que, exceto no tratamento com 2,5 mg de HP com 12 dias de exposição, nos demais tratamentos não houve efeito do elicitor estatisticamente significante sobre sua produção.

Tabela 12: Produção de Wedelolactona (mg/g PS) em *hairy roots* de *Eclipta prostrata* (L) L. controle e tratadas com 2,5 mg, 6,25 mg e 12,5 mg de Homogenato de parede do fungo *L. pseudotheobromae* após 4, 8 e 12 dias de exposição.

TRATAMENTO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (dias)		
	4	8	12
Controle	2,08aA	1,55aA	2,11bA
2,5 mg	2,62aA	1,71aB	2,86aA
6,25 mg	2,52aA	1,48aB	1,70bB
12,5 mg	2,51aA	1,40aB	1,30bB

As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O conhecimento sobre o mecanismo de ação e composição de elicitores ainda são fatores limitantes devido a sua alta complexidade (ESTRADA et al., 2016). O homogenato de parede do fungo apresentou efeito elicitor principalmente para o composto 3,5-diCQA e DWL. Em um estudo realizado por Linares et al (2010), o fermentado do mesmo fungo foi analisado mediante o seu potencial fitorregulador em sementes de *Capsicum frutescens*, o qual demonstrou-se eficiente na intensificação de frutos/plantas com aumentos de 11,7 vezes quando comparado ao tratamento controle. Estes dados revelam o potencial deste agente fúngico tanto no metabolismo primário quanto no secundário, com a indução de compostos.

6.5 INCORPORAÇÃO DE 2-¹³C-ACETATO DE SÓDIO E 3-¹³C-FENILALANINA EM *Hairy roots* DE *E. prostrata*

Os compostos isotopicamente marcados foram adicionados às culturas de *hairy roots* de *E. prostrata* visando a confirmação da rota biossintética dos compostos WL, DWL e 3,5-diCQA. A tabela 13 mostra os dados de incorporação de ¹³C nos compostos WL (1), DWL (2) e 3,5-diCQA (3) após experimentos de marcação isotópica utilizando 2-¹³C-acetato de sódio e 3-¹³C-fenilalanina. Os experimentos foram realizados utilizando espectrometria de massas em alta resolução pois esta técnica permite afirmar com precisão se houve incorporação de ¹³C. Durante a incorporação, a cada ¹³C adicionado, esperava-se um M+1 adicionado. O cálculo é baseado na razão entre o íon molecular em modo negativo (M-H) e seus isótopos M+1, M+2 e M+3 (Equação 1). Quanto menor o valor da razão (menor diferença entre o M-H e seu isótopo correspondente M+1, M+2 ou

M+3), maior é o enriquecimento de ^{13}C , confirmando-se assim a incorporação do precursor marcado com ^{13}C (Figuras 6, 7 e 8). Os cumestanos 1 e 2 incorporaram 3 unidades de acetato ($2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetato de sódio) e, portanto, selecionou-se o íon M+3, mostrando que a via do acetato é a via operante na biossíntese destes compostos. Já no experimento utilizando o $3\text{-}^{13}\text{C}$ -fenilalanina apenas uma unidade de fenilalanina foi incorporada e, portanto, selecionou-se o íon M+1 (Figuras 6, 7 e 8). É interessante observar que na biossíntese dos compostos WL e DWL houve uma diferença significativa nos valores da incorporação do acetato (Figuras 6 e 7). Através desta análise é possível inferir que a DWL (2) provavelmente é o precursor da WL (1), uma vez que a incorporação foi maior do que aquela observada em WL. A marcação isotópica do 3,5-diCQA (3) levou a incorporação de 2 unidades de fenilalanina ($3\text{-}^{13}\text{C}$ -fenilalanina) confirmando a via do chiquimato operante para biossíntese deste composto (Figura 8).

Figura 8: Estrutura da Wedelolactona (1), Demetilwedelolactona (2) e do ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3).

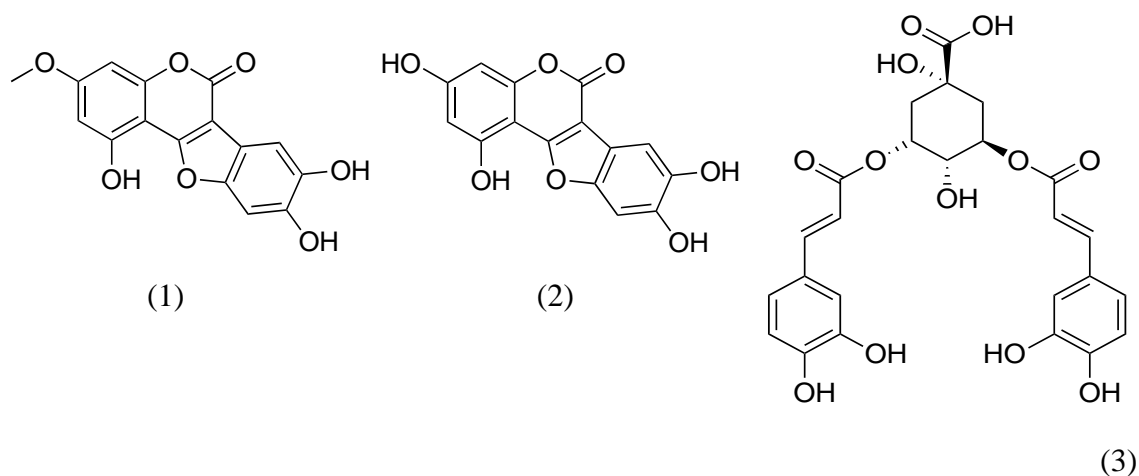


Tabela 13: Experimentos de marcação isotópica utilizando 2-¹³C-acetato de sódio e 3-¹³C-fenilalanina nas raízes de *E. prostrata*.

Substância	Razão	controle	2-¹³C- acetato de sódio	3-¹³C- fenilalanina
wedelolactona (1)	RM+1	5,2	-	4,7
	RM+3	113,2	39,4	-
demetil-wedelolactona (2)	RM+1	5,2	-	3,6
	RM+3	219,6	4,19	-
ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3)	RM+2	12,5	-	1,22

(RM+1: razão entre a intensidade do pico M-H e a do M+1; RM+2: razão entre a intensidade do pico M-H e M+2; RM+3: razão entre a intensidade do pico M-H e M+3)

Ex: $RM+1 = \frac{M-H}{M+1}$ (Equação 1)

Figura 9: Espectros de massas dos experimentos de marcação isotópica para a Wedelolactona (1) (Massa molar = 314,246). Espectro a= controle, Espectro b= 2-¹³C-acetato de sódio, Espectro c= 3-¹³C-fenilalanina.

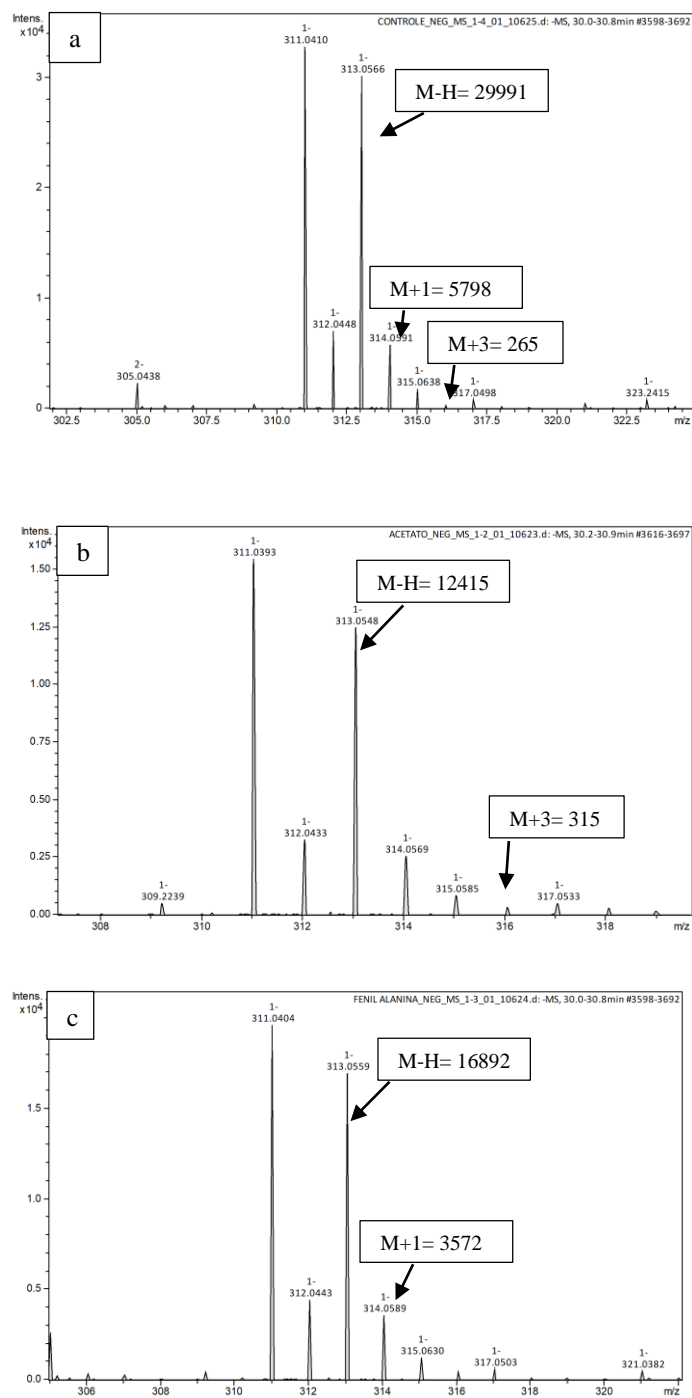


Figura 10: Espectros de massas dos experimentos de marcação isotópica para a Demetilwedelolactona (2) (Massa molar= 300,219). Espectro a= controle, Espectro a1= controle (ampliação), Espectro b= 2-¹³C-acetato de sódio, Espectro c= 3-¹³C-fenilalanina.

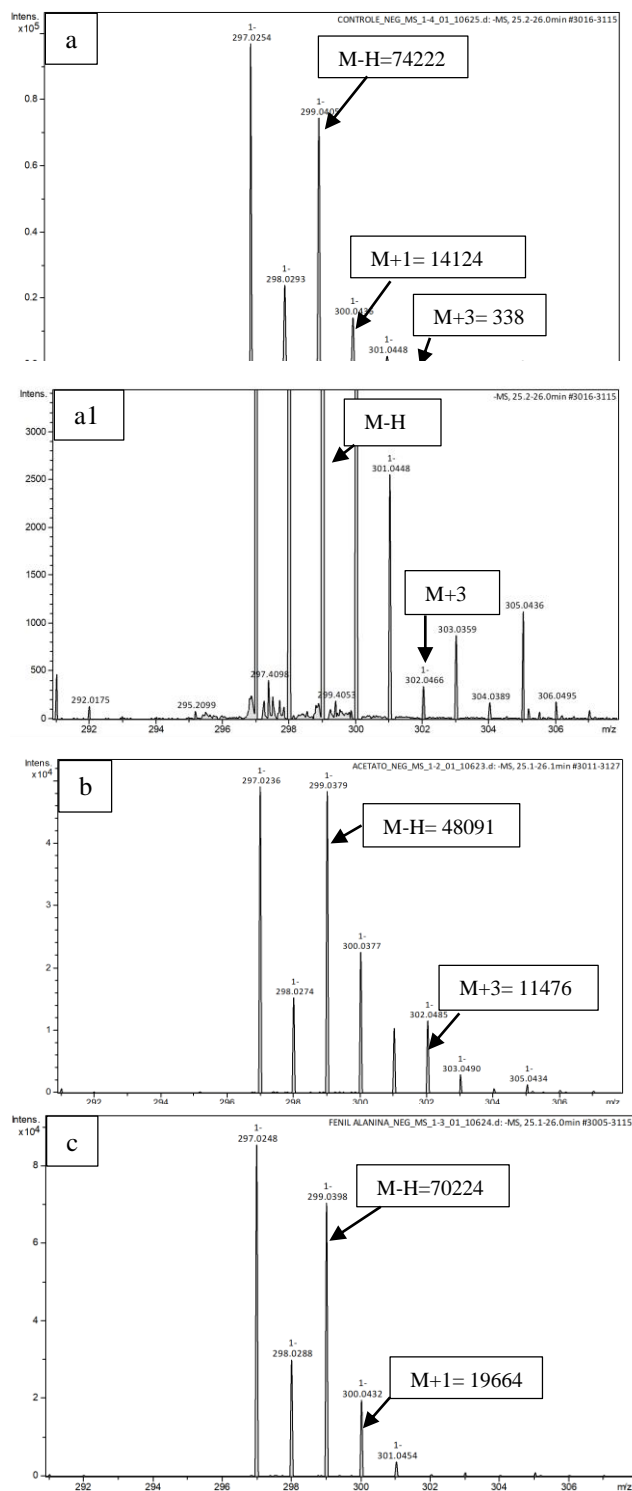
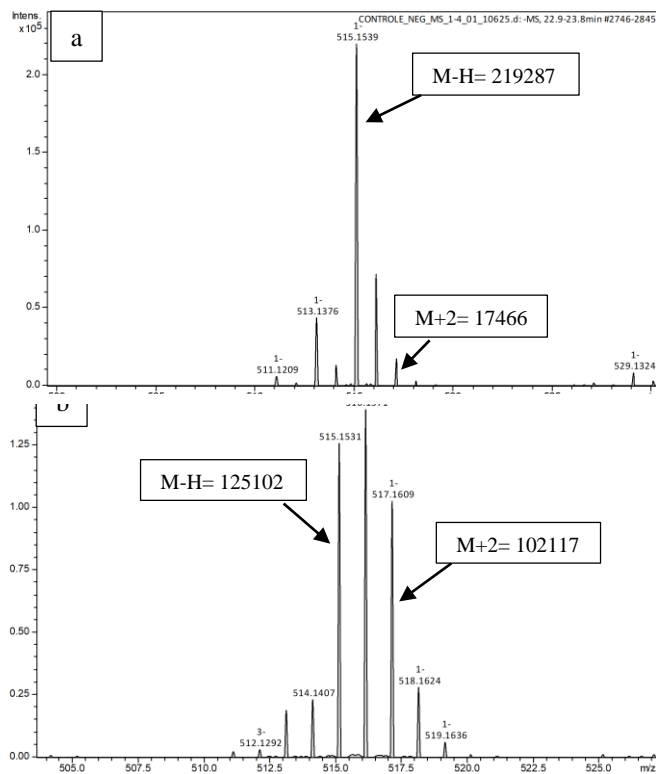
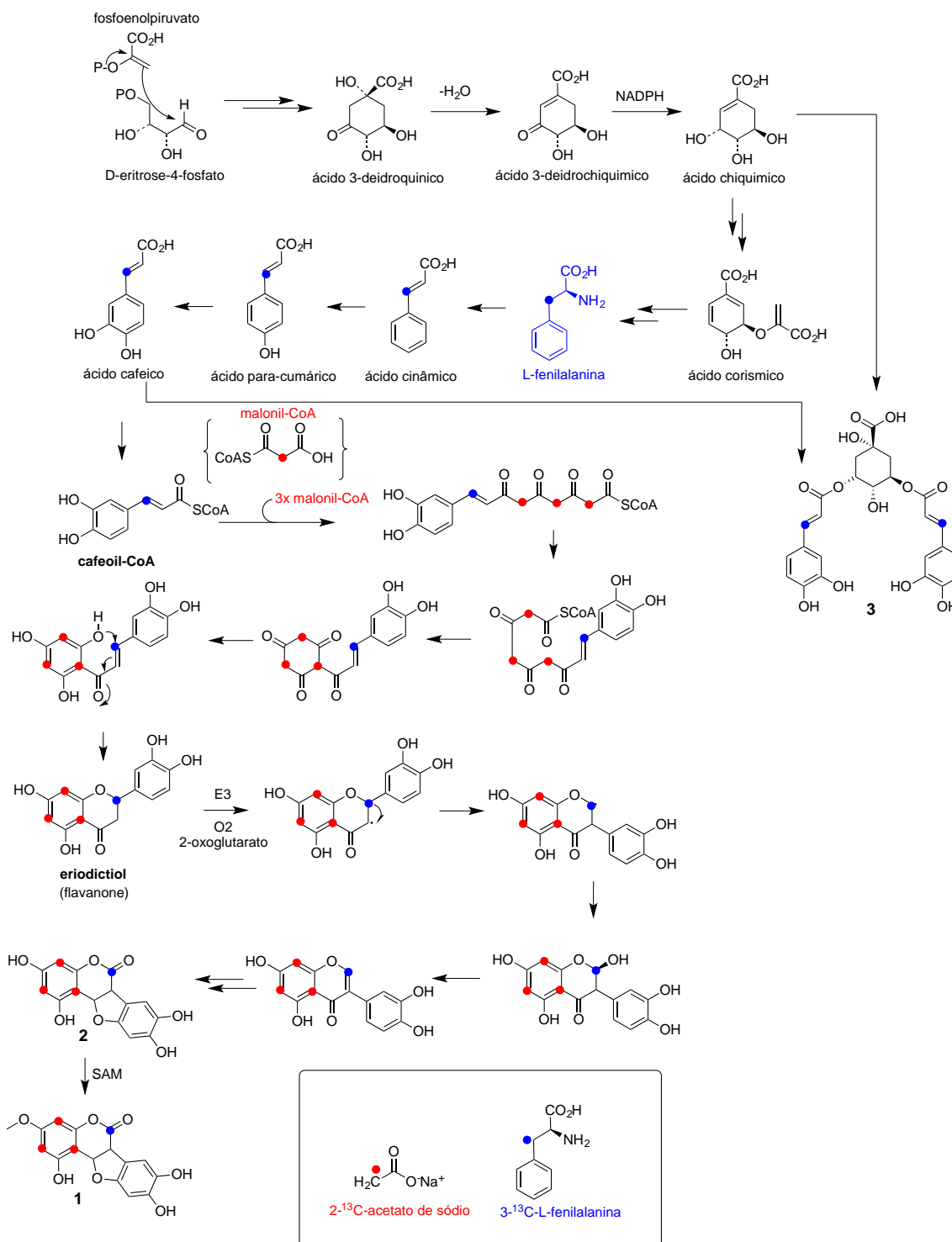


Figura 11: Espectros de massas dos experimentos de marcação isotópica para o ácido 3,5-Di-O-caffeoylquinico (3) (massa molar 515,443). Espectro a= controle, Espectro b= 3-¹³C-fenilalanina.



A Figura 12 ilustra a biossíntese dos compostos WL, DWL e 3,5-diCQA com as respectivas identificações incorporações dos compostos 2-¹³C-acetato de sódio e 3-¹³C-fenilalanina.

Figura 12: Biossíntese de wedelolactona (1), demetilwedelolactona (2) e ácido 3,5-Di-O-cafeoylquinico (3) após incorporação de 2-¹³C-acetato de sódio (vermelho) e 3-¹³C-fenilalanina (azul) nas raízes de *E. prostrata*.



CONCLUSÕES

Os efeitos dos agentes elicitores sobre as produções dos compostos alvo WL, DWL e 3,5-di-CQA ocorreram de forma diferenciada, sendo:

- MJ apresentou maior efeito sobre a produção de 3,5-di-CQA, após 8 dias de exposição. Análise de regressão polinomial mostrou que a concentração ótima de MJ a ser adicionada nas culturas visando maior produção de 3,5-di-CQA deverá ser de 92,62µM.
- O agente AS proporcionou maior efeito elicitor sobre a produção de DWL, após 8 dias de exposição. Análise de regressão polinomial mostrou que a adição de 62,13µM de AS deverá proporcionar maior aumento da produção de DWL se as *hairy roots* forem coletada 8 dias após a adição.
- A adição de EL apresentou efeito elicitor sobre a produção de 3,5-di-CQA, sendo 4 dias de exposição o tempo suficiente para a resposta ao agente. Análise de regressão polinomial evidenciou que para a obtenção de maior aumento de produção do composto a adição deverá ser de 17,69 mg de EL.
- O uso de HP apresentou efeito elicitor sobre a produção do 3,5-diCQA com 4 dias de exposição, de forma dose dependente. Por meio da análise de regressão polinomial a dose identificada para a indução de maior aumento da produção de 3,5-diCQA deverá ser 8,82 mg de HP.
- Sobre a produção dos cumestanos DWL e WL os agentes bióticos HP e EL não proporcionaram aumentos em sua produção. No entanto, os agentes elicitores MJ e AS proporcionaram aumento tanto de DWL quanto de WL.
- Apesar de MJ ter se apresentado como o melhor agente elicitor a produção de 3,5-di-CQA pelas *hairy roots* de *E. prostrata*, este composto majoritário foi influenciado tanto por elicitores bióticos quanto abióticos.

A adição dos agentes 2-¹³C-acetato de sódio e 3-¹³C-fenilalanina isotopicamente marcados às culturas de *hairy roots* de *E. alba* possibilitou confirmar, para o composto 3,5-di-CQA, a via do chiquimato como a operante para biossíntese do mesmo. Enquanto que, para os compostos WL e DWL as incorporações mostraram que a via do acetato é a via operante na biossíntese destes cumestanos. A maior incorporação do acetato na molécula de DWL possibilitou inferir que ela provavelmente é precursora da WL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, N. et al. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. **Chemico-Biological Interactions.**, 2017.
- AHMED, S. A.; BAIG, M. M. Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 499-504, 2014.
- ALI, A. M. A.; EL-NOUR, M. E. M.; YAGI, S. M. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus, and callus treated with some elicitors. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2018.
- ANGELOVA, Z.; GEORGIEV, S.; ROOS, W. Elicitation of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 20, n. 2, p. 72- 83, 2006.
- ANSARI, M. A. et al. Evaluation of Polyphenolic Compounds and Pharmacological Activities in Hairy Root Cultures of *Ligularia fischeri* Turcz. f. *spiciformis* (Nakai). **Molecules.**, v. 24, n. 1586, p. 2-20, 2019.
- ALSOUFI, A. S. M. et al. Influence of Selected Abiotic Factors on Triterpenoid Biosynthesis and Saponin Secretion in Marigold (*Calendula officinalis* L.) in Vitro Hairy Root Cultures. **Molecules.**, v. 24, n. 2907, p. 2-17, 2019.
- ARYA, R. K et al. Anti-breast tumor activity of *Eclipta* extract *in-vitro* and *in-vivo*: novel evidence of endoplasmic reticulum specific localization of Hsp60 during apoptosis. **Scientific RepoRts**, 2015.
- BROOThAERTS, W. et al., Gene transfertoplantsbydiverseof bactéria. **Nature**, V. 433, p. 629-633, 2005.
- BRUCKNER, A. et al. De novo biosynthesis of simple aromatic compounds by an arthropod (*Archezogetes longisetosus*). **The Royal Society**. v. 287, p. 1-9, 2020.
- CAI, Z. et al. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. **Plant Cell Rep**, v. 31, p. 461-477, 2012.
- CHAUDHARY, H.; DHUMA, V.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SESHADRI, S. "Evaluation of hydro-alcoholic extract of *Eclipta alba* for its anticancer potential: an in vitro study," **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 363–367, 2011.
- CHERUVU, H. S. et al. LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of luteolin, wedelolactone and apigenin in mice plasma using hansen solubility parameters for liquid-liquid extraction: application to pharmacokinetics of *Eclipta alba* chloroform fraction. **Journal of Chromatography B.**, 2018.

CHO, Y. J.; WOO, J. H.; LEE, J. S.; JANG, D. S.; LEE, K. T.; CHOI, J. H. "Eclalbasaponin II induces autophagic and apoptotic cell death in human ovarian cancer cells," **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 132, n. 1, p. 6–14, 2016.

CONTRERAS, A. et al. Proteomic analysis reveals novel insights into tanshin biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza hairy roots*. **Scientific Reports.**, 2019.

CUONG, D. M. et al. Enhancement of Glucosinolate Production in Watercress (*Nasturtium officinale*) Hairy Roots by Overexpressing Cabbage Transcription Factors. **Agric. Food Chem.**, v. 67, p. 4860-4867; 2019

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* sprengel e *mikania laevigata* schulyz bip. ex baker. **Rev. Bras. Plantas med.** v. 14, n. 2, p. 1516-0572, 2012.

DEEPTHI, S.; SATHEESHKUMAR, K. Enhanced camptothecin production induced by elicitors in the cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* Linn. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, 2015.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2 ed. **Wiley, England –UK**, 2002.

DIOGO, L.C.; FERNANDES, R.S.; MARCUSSI, S.; MENALDO, D.L.; ROBERTO, P.G.; MATRANGULO, P.V.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S. C.; GIULIATTI, S.; SOARES, A.M.; LOURENÇO, M.V. Inhibition of snake venoms and phospholipases A(2) by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. **Basic Clin. Pharmacol Toxicol**, v. 104, n. 4, p. 293-299, 2009.

DISSANAYAKE, A. J. et al. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes pedicel and peduncle discolouration of grapes in China. **Australasian Plant Dis.**, v. 10, n. 21, p. 1-5, 2015.

ESTRADA, K. R. et al. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. **Molecules.**, v. 21, n. 182, p 1-24, 2016.

FAIZAL, A.; SARI, A. Veningtia. Enhancement of saponin accumulation in adventitious root culture of Javanese ginseng (*Talinum paniculatum* Gaertn.) through methyl jasmonate and salicylic acid elicitation. **African Journal of Biotechnology**. v. 18(6), p. 130-135, 2019.

FARRELL, K. 1.; ASRAFUL, M. J.; KOVINICH, Nik. Distinct Mechanisms of Biotic and Chemical Elicitors Enable Additive Elicitation of the Anticancer Phytoalexin Glyceollin I. **Molecules**, v. 22, n. 1261, p. 2-13, 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

- FOLGADO, A. et al. Toward alternative sources of milk coagulants for cheese manufacturing: establishment of hairy roots culture and protease characterization from *Cynara cardunculus* L. **Plant Cell Reports.**, 2019.
- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, Regina Aparecida Correia; MACHADO, Maria de Fátima Pires Silva et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.18 n.4, 2008.
- GAUME, A.; KOMARNYTSKY, S.; BORISJUK, N.; RASKIN, I. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. **Plant Cell Rep** v. 21, p. 1188–1193, 2003.
- GONG, X. X. et al. The protective effect of chlorogenic acid on bovine mammary epithelial cells and neutrophil function. **American Dairy Science Association.**, v. 101, p. 10089-10097, 2018.
- GOVINDARAJAN, M.; KARUPPANNAN, P. Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.**, 2011.
- GUAN, Y. et al. Effect of methyl jasmonate on phenolic accumulation in wounded broccolis. **Molecules.**, v. 24, n. 3537, p. 1-18, 2019.
- GUENNÉ, S. et al. Phytochemistry and neuroprotective effects of *Eclipta alba* (L.) Hassk. **Journal of Complementary and Integrative Medicine.**, 2019.
- GUIMARÃES, C. Studart et al., Transformação genética em espécies florestais. **Ciência florestal.** v. 13 n. 1, 2003.
- GUNJEGAOKAR, S. M.; SHANMUGARAJAN, T. S. Molecular mechanism of plant stress hormone methyl jasmonato for its ant-inflammatory activity. **Plant Signaling & Behavior.**, v. 14, n. 10, p. 1-8, 2019.
- GUPTA, A. et al. Ethyl acetate fraction of *Eclipta alba*: a potential phytopharmaceutical targeting adipocyte differentiation. **Biomedicine & Pharmacotherapy.**, v. 96, p. 572-583, 2017.
- HAO, X.; et al. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on tanshinone production and biosynthetic gene expression in transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Biotechnology and Applied Biochemistry.**, v. 00, n. 0, p. 1-13, 2014.
- HONG, S. et al. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of 3,5 Dicafeoylquinic Acid Isolated from *Ligularia fischeri* Leaves. **KoSFoST and Springer.**, v. 24(1), p. 257-263, 2015.
- HUANG, B.; LIN, H.; YAN, C.; QIU, H.; QIU, L.; YU, R. Optimal inductive and cultural conditions of *Polygonum multiflorum*

transgenic *Hairy roots* mediated with *Agrobacterium rhizogenes* R1601 and an analysis of their anthraquinone constituents. **Pharmacogn Mag.**, v. 10, no 37, p. 77–82. 2014.

Ionkova, I. Effect of methyl jasmonate on production of ariltetralin lignans in hairy root cultures of *Linum tauricum*. **Pharmacogn.**, v. 1, p. 102–105, 2009.

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Rearsh.**, v. 52, n. 39, p. 1-25, 2019.

JUNIOR, A. C. **Constituintes Químicos da Espécie Vegetal *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae)**. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Santa Catarina, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em química, 9p, 2002.

KIM, H. Y.; KIM, H. M.; RYU, B.; LEE, J. S.; CHOI, J. H.; JANG, D. S. “Constituents of the aerial parts of *Eclipta prostrata* and their cytotoxicity on human ovarian cancer cells *in vitro*.” **Archives of Pharmacal Research.** v. 38, n. 11, p. 1963–1969, 2015.

KIM, O. T., KIM, M. Y., HONG, M. H. et al . Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. **Plant Cell Rep** v. 23, p. 339-344, 2004.

KHURSHID, R. et al. Biosynthesis of precious metabolites in callus cultures of *Eclipta alba*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**., v. 135, p. 287-298, 2018.

KUMAR, S.; DHANANI, Tushar. Development and validation of a rapid high performance liquid chromatography - photodiode array detection method for estimation of a bioactive compound wedelolactone in extracts of *Eclipta alba*. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo , v. 49, n. 1, p. 57-63, 2013 .

LEE, K. Y., HA, N. R., KIM, T. B., KIM, Y. C., SUNG S. H. Characterization of triterpenoids, flavonoids and phenolic acids in *Eclipta prostrata* by high-performance 68 liquid chromatography/diode-array detector/electrospray ionization with multi-stage tandem mass spectroscopy. **Natural Product Sciences**, v. 16, n. 3, p. 164–168, 2010.

LEE, Y.J.; LIN, W.L.; CHEN, N.F.; CHUANG, S.K.; TSENG, TH. Demethylwedelolactone derivatives inhibit invasive growth *in vitro* and lung metastasis of MDA-MB-231 breast cancer cells in nude mice. **Eur J Med Chem.**, v. 56, p. 361-367, 2012.

LEE, Y. S. et al. Enhancement of AntiInflammatory Activity of *Aloe vera* Adventitious Root Extracts through the Alteration of Primary and Secondary Metabolites via Salicylic AcidElicitation. **PLOS ONE.**, 2013.

LINARES A. M. P.; HERNANDES C; FRANÇA S. C.; LOURENÇO M. V. 2010. Atividade fitorreguladora de jasmonatos produzidos por *Botryosphaeria rhodina*. **Horticultura Brasileira** v. 28, p. 430-434. 2010.

LIU, S. et al. Comparative transcriptomic analysis of key genes involved in flavonoid biosynthetic pathway and identification of flavonol synthase from *Artemisia Annuua* L. Department of Tea Science, College of Horticulture and Hardening, Hunan **Agricultural University, Changsha**, 410128, 2017.

LIRDPRAPAMONGKOL, K.; KRAMB, J. P.; CHOKCHAICHAMNANKIT D.; et al. "Juice of *Eclipta prostrata* inhibits cell migration in vitro and exhibits anti-angiogenic activity in vivo," **In Vivo**, v. 22, n. 3, p. 363–368, 2008.

MAHESH, V. et al. Functional characterization of two *p*-coumaroyl ester 3 ϕ -hydroxylase genes from coffee tree: evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis. **Plant Mol Biol.**, v. 64, p. 145-159, 2007.

MATTOS-JÚNIOR, D. et al. Uso de elicitores para defesa em plantas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.65-74, 2010.

MANVAR, D. et al. Identification and evaluation of anti Hepatitis C vírus phytochemicals from *Eclipta alba*. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 144, p. 545-554, 2012.

MENDOZA, D. et al. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. **Published by Elsevier B.V.**, 2018.

NARAYANI, M; SRIVASTAVA, Smita. Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. **Phytochem Rev.** V. 16, p.1227–1252, 2017.

NGUYEN, K.V., PONGKITWITOON, B., PATHOMWICHAIWAT, T. et al. Effects of methyl jasmonate on the growth and triterpenoid production of diploid and tetraploid *Centella asiatica* (L.) Urb. hairy root cultures. **Sci Rep** **9**, 18665 2019.

OOTANI, M. A. et al. Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity.** v. 4, n. 2, p. 162-174, 2013.

PENA, M. H., et al. VI Botânica no Inverno. Instituto de biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016.

PETRUSSA, E. et al. Plant Flanoids-Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. **Molecular Sciences.**, v. 14, p. 14950-14973, 2013.

PERRALES, A. et al. The interplay between mutant p53 and the mevalonate pathway. **Cell Death & Differentiation.** v. 25, p. 460-470, 2017.

RAY, A.; BHARALI, P; KOONWAR, B. K. Mode of Antibacterial Activity of Eclalbasaponin Isolated from *Eclipta alba*. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 171, p. 2003-2019, 2013.

SALMA, U. et al. Elicitor mediated enhancement of wedelolactone in cell suspension culture of *Eclipta alba* (L.) Hassk. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**., 2018.

SHARAN, S. et al. Elicitor-mediated enhanced accumulation of ursolic acid and eugenol in hairy root cultures of *Ocimum tenuiflorum* L. is age, dose, and duration dependent. **South African Journal of Botany.**, v. 124, p. 199-210, 2019.

SHEN, P. et al. Wedelolactone from *Eclipta alba* inhibits lipopolysaccharide-enhanced cell proliferation of human renal mesangial cells via NF- κ B signaling pathway. **Am J Transl Res** v. 9(5), p. 2132-2142. 2017.

SIMIC, S. Gadzovska et al. Fungal elicitor-mediated enhancement in phenylpropanoid and naphthodianthrone contents of *Hypericum perforatum* L. cell cultures. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** V. 122, p. 213–226. 2015.

THAKUR, V.D.; MENGI, S.A. Neuropharmacological profile of *Eclipta alba* (Linn.) Hassk. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p.23–31, 2005.

TUAN, P. A. et al. Molecular characterization of flavonoid biosynthetic genes and accumulation of baicalin, baicalein, and wogonin in plant and hairy root of *Scutellaria*. **Saudi journal of Biological Sciences lateriflora.**, 2016.

VINAGRE, C. et al. The use of medicinal plants by the population from the Protected Landscape of “Serra de Montejunto”, Portugal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.**, v. 15, n. 30, p. 1-30, 2019.

WANG, F. et al. Transcriptome Analysis of Salicylic Acid Treatment in *Rehmannia glutinosa* Hairy Roots Using RNA-seq Technique for Identification of Genes Involved in Acteoside Biosynthesis. **Frontiers in Plant Science.**, v. 8, n. 787, p. 2-15, 2017.

XIÃO, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance?. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.**, v. 57, n. 9, p. 1874-1905, 2015.

XIA, H. et al. The Mevalonate Pathway Is a Druggable Target for Vaccine Adjuvant Discovery. v. 175, p. 1059-1073, 2018.

XU, C.; WEI, B.; FU, X.; LUO, M.; LIU, S.; LI, R.; REN, B.; TANG, L. Effect of *Eclipta prostrata* on 11Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase in Rat Liver and Kidney. Evid Based **Complement Alternat Med.**, v. 14, p. 651- 053, 2014.

YADAV, N. K. et al. Alcoholic Extract of *Eclipta alba* Shows *In Vitro* Antioxidant and Anticancer Activity without Exhibiting Toxicological Effects. **Hindawi.**, v. 2017, p. 18, 2017.

YING, D. L. “Te research progress in chemical constituents, pharmacological effects and clinic application of *Eclipta prostrata*,” **China Pharmaceutical Journal**, v. 19, p. 2876–2878, 2008.

ZHAO, Y.; PENG, Y.; LU, W. Effect of *Eclipta prostrata* on lipid metabolism in hyperlipidemic animals,” **Experimental Gerontology**, v. 62, p. 37–44, 2015.

ZLOTEK, U. Effect of jasmonic acid and yeast extract elicitation on low-molecular antioxidants and antioxidant activity of marjoram (*Origanum majorana* l.). **Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.**, v. 16(4), n. 2017, p. 371-377, 2017.