

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

SARAZETE IZIDIA VAZ PEREIRA

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Eclipta prostrata*  
CULTIVADA *EX VITRO* E POR CULTIVO CELULAR *IN VITRO***

**RIBEIRÃO PRETO  
2022**

SARAZETE IZIDIA VAZ PEREIRA

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Eclipta prostrata*  
CULTIVADA *EX VITRO* E POR CULTIVO CELULAR *IN VITRO***

Tese de doutorado apresentada à  
Universidade de Ribeirão Preto UNAERP,  
como requisito para a obtenção do título de  
Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Soares  
Pereira  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Helena Taleb  
Contini

**RIBEIRÃO PRETO  
2022**

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

P436p PEREIRA, Sarazete Izidia Vaz, 1968-  
Produção de compostos bioativos de *Eclipta prostrata*  
cultivada *ex vitro* e por cultivo celular *in vitro* / Sarazete Izidia  
Vaz Pereira. – Ribeirão Preto, 2023.  
72 f.: il. color.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Soares Pereira.

Tese (Doutorado) – Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Doutorado em Biotecnologia, 2023.

1. Compostas (Botânica). 2. Biotecnologia. 3. Ácido.  
II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus guias espirituais por toda luz e bondade em minha vida.

Quero agradecer ao meu grande amor Andréia Pereira Ramos, por todo carinho, por todo companheirismo, por toda atenção, por todo espírito de luz que tem sido presente em minha vida. A melhor filha do mundo!

Agradeço a Suzana (Pink) por todo amor, carinho, respeito, companheirismo e amizade e principalmente por todas as noites que eu achava que não iria conseguir e ela sempre me dizia: - Não pense assim, vai dar tudo certo. Meu muito obrigada!

Quero agradecer a alguns amigos especiais que sempre torceram muito e acreditaram em mim, quando nem eu mesma acreditava. Quero agradecer a Juliana, ao Lucas, Gustavo e a Camila Guimarães.

Agradeço a minha amiga Norma por todo carinho, por cada vez que estava muito difícil e ela sempre me fazia um chazinho para que tudo melhorasse. Obrigada Norminha!

Quero agradecer a todos aqueles que estiveram em minha vida de uma forma direta e indireta.

Ao Eduardo, um amigo e tanto; ao Junior, que sempre me deu um bom sorriso, ao Jefferson *in memoria*, que sempre falava muito que tudo ia dar certo

A minha família, aos meus pais e irmãos, pelo carinho. Muito obrigada!

Um agradecimento todo especial a Professora Ana Maria por ter aceitado ser minha orientadora e porque quando as coisas estavam impossíveis, ela sempre dava um toque e tudo acontecia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ALS	Acetolactato sintase
ANA	Ácido naftaleno acético
BAP	Benzilaminopurina
EC	Energia de colisão
CLAE	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida De Ultra Eficiência
CLUE-EM	Cromatografia Líquida De Ultra Eficiência Acoplada A Espectrometria De Massas
CLUE-EM-Q/TOF	Cromatografia Líquida De Ultra Eficiência Acoplada A Espectrômetro De Massas Com Alta Resolução E Exatidão De Massa
cm	Centímetro
COSY	Espectroscopia de correlação - <i>Correlation Spectroscopy</i>
Covid-19	Doença, pandêmica estabelecida em dezembro de 2019, causada pelo vírus SARS-CoV-2
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DWD	Demetilwedelolactona
EC	Fração rica em coumestanos e ésteres do ácido cafeico
EP	<i>Eclipta prostrata</i>
Ep	Genótipo de <i>Eclipta prostrata</i>
EPG	Acesso de <i>Eclipta prostrata</i> cultivada no Guarujá
EPJ	Acesso de <i>Eclipta prostrata</i> cultivada em Jardinópolis
FMA	Fungos micorrizicos arbusculares
g	Gramma
GPS	Sistema de geoposicionamento global
h	Hora

ha	Hectare
HIV	Virus da imunodeficiência humana
HMBC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações - <i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HPMURP	Herbário de Plantas Medicinias da Universidade de Ribeirão Preto
HSQC	Correlação heteronuclear de quantum único - <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IBA	Ácido Indol-Butírico
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
kg	Quilo
L	Litro
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
m	Metro
MeOH	Metanol
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
EM	Espectrometria de Massas
MS/MS	Massa/Massa
MS	Meio de cultura Murashige & Skoog
nm	Nanometro
NO	Oxido nítrico
PA	Parte aérea
p/p	Razão peso/peso
p/v	Razão peso/volume
PI	Íons de produto
PS	Peso seco

psi	Libra-força por polegada quadrada
RAPD	DNA polimórfico ampliado ao acaso - Random Amplified Polymorphic DNA
RDE	Relação droga extrato
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
rpm	Rotações por minuto
SARS-CoV-2	Vírus da família dos coronavírus que, ao infectar humanos, causa uma doença chamada Covid-19
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Ton	Tonelada
Ton/ha	Toneladas por hectare
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Razão volume/volume
WD	Wedelolactona
WP	Meio de cultura Wood Plant desenvolvido por McCown & Lloyd
2,4 D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
3,5-diCQA	Ácido 3,5-dicafeoilquínico
5-CQA	Ácido 5-O-cafeoilquínico
$\mu$ L	Microlitro

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Fluxograma de etapas realizadas durante a execução do trabalho.....	23
<b>Figura 2</b> - Planta <i>in vitro</i> retirada do meio de cultura e lavada em água corrente (A e B), planta <i>in vitro</i> transferida para copo plástico com substrato (C), planta <i>in vitro</i> na casa de vegetação (D), planta <i>in vitro</i> com 30 e 45 cm crescidas na casa de vegetação (E) e plantio no campo (F).....	30
<b>Figura 3</b> - Estabelecimento de acessos de <i>Eclipta prostrata in vitro</i> . Sementes submetidas a assepsia (A), germinação de semente introduzida (B) e estabelecimento de planta <i>in vitro</i> (C).....	37
<b>Figura 4</b> - Planta de <i>E. prostrata</i> cultivadas <i>in vitro</i> (A), raízes gerando calos (B) calos formados (C) e cultura de células em suspensão (D).....	38
<b>Figura 5</b> – Cromatograma das soluções químicas de referência wedelolactona (A), ácido 3,5-dicafeoil- <i>epi</i> -quínico (B), ácido 5-O-cafeoilquínico (C) e perfil cromatográfico de extrato obtido de células em suspensão, fração denominada EC cultivadas por 45 dias (D), em $\lambda = 350$ nm.....	40
<b>Figura 6</b> - Substâncias isoladas de calos e células em suspensão <i>Eclipta prostrata</i> e identificadas por métodos espectroscópicos.....	41
<b>Figura 7</b> - Biomassa seca de células em suspensão de <i>E. prostrata</i> cultivadas por 60 dias e concentração de ácido 5-O-cafeoilquínico, demetilwedelolactona e do ácido 3,5-dicafeoil- <i>epi</i> -quínico.....	42
<b>Figura 8</b> - Dados de temperatura e precipitação acumulada dos municípios de Guarujá e Jardinópolis.....	45
<b>Figura 9</b> - Análise de <i>heatmap</i> de compostos majoritários de <i>Eclipta prostrata</i> (por teste t e correção FDR com valor $p < 0,05$ ) identificados por CLUE-EM-Q/TOF. Sendo, EPG-Guarujá e EPJ-Jardinópolis.....	46
<b>Figura 10</b> – Incidência solar média nas regiões onde estão situados os municípios de Guarujá e de Jardinópolis, no estado de São Paulo.....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Frações coletadas a partir da eluição de extrato em coluna de sephadex LH-20.....	34
<b>Tabela 2</b> - Frações coletadas a partir da eluição de extrato em coluna de sephadex LH-20.....	34
<b>Tabela 3</b> - Teor de wedelolactona e demetilwedolactona de genótipos mantidos na coleção do Horto medicinal da Farmácia da Natureza.....	35
<b>Tabela 4</b> - Efeito dos meios de cultura MS e WP na comprimento da parte aérea da planta <i>in vitro</i> , comprimento da raiz, peso seco da parte aérea e raiz de plantas cultivadas <i>in vitro</i> de <i>Eclipta prostrata</i> .....	37
<b>Tabela 5</b> - Efeito do meio MS e WP no teor de wedelolactona e demetilwedolactona na parte aérea e raiz de planta <i>in vitro</i> cultivadas de <i>Eclipta prostrata</i> .....	38
<b>Tabela 6</b> - Efeito de ambiente climatizado no comprimento da parte aérea de planta, peso fresco e seco de parte aérea e raiz, extrato seco e teor de wedelolactona e demetilwedolactona.....	44
<b>Tabela 7</b> - Teor de wedelolactona e demetilwedolactona em plantas micropropagadas cultivadas no campo por 30 dias.....	44
<b>Tabela 8</b> - Comprimento da parte aérea da planta, pesos de massa seca e fresca e quantificação de wedelolactona e demetilwedolactona em plantas de <i>Eclipta prostrata</i> cultivadas nos municípios de Guarujá-SP e Jardinópolis-SP.....	45
<b>Tabela 9</b> - Frações coletadas a partir da eluição de extrato hidroetanólico submetido a fracionamento em coluna de sephadex LH-20.....	49
<b>Tabela 10</b> - Frações coletadas a partir da eluição de fração PA.4 em coluna de sephadex LH-20.....	49
<b>Tabela 11</b> - Dados espectroscópicos do ácido 5-O-cafeoilquínico.....	51
<b>Tabela 12</b> - Dados espectroscópicos do ácido 3,5-dicafeoil- <i>epi</i> -quínico.....	51

## RESUMO

*Eclipta prostrata* é uma planta medicinal, com atividade anti-hepatotóxica e anti-inflamatória, amplamente utilizada no Oriente e em programas de fitoterapia no Brasil. Essa espécie é rica em coumestanos, sendo a wedelolactona um dos principais marcadores químicos. Este trabalho teve por objetivo avaliar acessos do horto da Farmácia da Natureza produtores de wedelolactona e demetilwedelolactona, bem como verificar o acúmulo destas substâncias em plantas cultivadas em dois municípios do estado de São Paulo. Além do acúmulo de coumestanos nas plantas cultivadas *ex vitro*, investigou-se o acúmulo dessas substâncias e dos ácidos 5-O-cafeoilquínico e 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico em plantas cultivadas *in vitro* e em cultura de células em suspensão. Para isto, foi estabelecido o cultivo de plantas em casa de vegetação e no campo, bem como plantio do indivíduo elite nos municípios de Jardinópolis e Guarujá e também o cultivo *in vitro* de s e cultura de células em suspensão. A quantificação dos metabolitos secundários foi realizada em CLAE analítico, o isolamento em CLAE preparativo, a identificação em CLUE-EM-Q/TOF e a identificação das substâncias isoladas foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear mono e bidimensional (COSY, HMBC, HMQC). As cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS e WP apresentaram diferenças quanto ao teor de coumestanos, sendo o meio WP mais efetivo para a produção de demetilwedelolactona por acumular, nas raízes cultivadas, 73 vezes mais este composto que o meio de cultura MS. As células em suspensão, produzidas a partir de raízes de *E. prostrata*, acumularam majoritariamente o ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico, sendo essa descoberta relatada pela primeira vez na espécie. Os genótipos de *Eclipta*, mantidos na coleção do Horto de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza, apresentaram uma variação quanto ao teor de coumestanos, com diferentes proporções entre eles e todos os genótipos acumularam wedelolactona. Plantas micropropagadas cultivadas em casa de vegetação ou no campo, por 30 dias, produziram elevado teor de coumestanos e as plantas cultivadas em Jardinópolis e no Guarujá apresentaram, entre si, teores semelhantes de wedelolactona. Entretanto, as plantas que cresceram na região costeira produziram mais triterpenos e saponinas e se desenvolveram menos que aquelas localizadas em Jardinópolis, as quais produziram mais flavonoides.

**Palavras-chave:** Ácido 5-O-cafeoilquínico. Ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico. Asteraceae. Demetilwedelolactona. Wedelolactona

## ABSTRACT

*Eclipta prostrata* is a medicinal plant with anti-hepatotoxic and anti-inflammatory activity, widely used in the East and in herbal medicine programs in Brazil. This species is rich in coumestans, with wedelolactone being one of the main chemical markers. This study aimed to evaluate wedelolactone and demethylwedelolactone accessions from the Farmácia da Natureza garden, as well as to verify the accumulation of these substances in plants grown in two municipalities in the state of São Paulo. In addition to the accumulation of coumestans in ex vitro cultivated plants, the accumulation of these substances and of 5-O-caffeoylquinic and 3,5-dicaffeoyl-epi-quinic acids in seedlings cultivated in vitro and in suspension cell culture was investigated. For this, the cultivation of plants in a greenhouse and in the field was established, as well as the planting of the elite individual in the municipalities of Jardinópolis and Guarujá and also the in vitro cultivation of seedlings and suspension cell culture. The quantification of secondary metabolites was performed in analytical HPLC, isolation in preparative HPLC, identification in UHPLC-MS-Q-TOF and the identification of isolated substances was performed by one and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy (COSY, HMBC, HMQC). Seedlings grown in vitro in MS and WP culture medium showed differences in coumestans content, being the most effective WP medium for the production of demethylwedelolactone as it accumulates, in the cultivated roots, 73 times more this compound than the MS culture medium. Suspension cells, produced from *E. prostrata* roots, mainly accumulated 3,5-dicaffeoyl-epi-quinic acid, this finding being reported for the first time in the species. The *Eclipta* genotypes, kept in the collection of Horto de Plantas Mediciniais da Farmácia da Natureza, showed a variation in terms of coumestans, with different proportions between them and all genotypes accumulated wedelolactone. Micropropagated plants cultivated in a greenhouse or in the field, for 30 days, produced high levels of coumestans and plants cultivated in Jardinópolis and Guarujá presented, among themselves, similar levels of wedelolactone. However, plants that grew in the coastal region produced more triterpenes and saponins and developed less than those located in Jardinópolis, which produced more flavonoids.

**Keywords:** 5-O-caffeoylquinic acid. 3,5-dicaffeoyl-epi-quinic acid. Asteraceae. Demethylwedelolactone. Wedelolactone.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1 A ESPÉCIE <i>Eclipta prostrata</i> .....	15
2.2 CULTURA DE TECIDOS DE <i>Eclipta prostrata</i> .....	16
2.3 ESTUDOS AGRONÔMICOS REALIZADOS COM <i>Eclipta prostrata</i> .....	18
<b>3 HIPÓTESE.....</b>	<b>20</b>
<b>4 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>21</b>
<b>5 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
5.1 OBJETIVO GERAL.....	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
6.1 ESTRATÉGIA DE TRABALHO.....	23
6.2 MATERIAL VEGETAL.....	24
6.3 AVALIAÇÃO DO TEOR DE COUMESTANOS EM INDIVÍDUOS MANTIDOS NA COLEÇÃO DO HORTO MEDICINAL DA FARMÁCIA DA NATUREZA.....	24
6.4 CULTIVO DE PLANTAS PROPAGADAS EM VIVEIRO E NO CAMPO.....	24
6.5 PLANTA <i>IN VITRO</i> DE <i>Eclipta prostrata</i> CULTIVADAS EM MEIO BASAL WPM E MSM.....	25
6.6 INTRODUÇÃO DE SEMENTES DE <i>Eclipta prostrata IN VITRO</i> E SELEÇÃO DE INDIVÍDUO ELITE.....	26
6.7 MULTIPLICAÇÃO DE PLÂNTULAS DE <i>Eclipta prostrata IN VITRO</i> .....	26
6.8 ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE <i>Eclipta prostrata IN VITRO</i> .....	26
6.9 CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	27
6.10 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS OBTIDOS DE CALOS DE <i>Eclipta prostrata</i> .....	27
6.11 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS OBTIDOS DE CALOS DE <i>Eclipta prostrata</i> .....	28
6.12 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DAS ESTRUTURAS ISOLADAS DA CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	28
6.13 ESTABELECIMENTO DE CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>Eclipta prostrata</i> .....	29
6.14 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS E QUANTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS DE INTERESSE EM CLAE.....	29
6.15 CULTIVO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS EM ESTUFA E NO CAMPO.....	30
6.16 CULTIVO DO CLONE Ep5 DE <i>Eclipta prostrata</i> NOS MUNICÍPIOS DO GUARUJÁ E JARDINÓPOLIS.....	31
6.17 ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE <i>Eclipta prostrata</i> CULTIVADA	

EM JARDINÓPOLIS E GUARUJÁ EM CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA ALTA EFICIÊNCIA (CLUE-EM-Q/TOF).....	32
6.18 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DA PLANTA <i>Eclipta prostrata</i> .....	33
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
7.1 AVALIAÇÃO DO TEOR DE COUMESTANOS EM INDIVÍDUOS MANTIDOS NA COLEÇÃO DO HORTO MEDICINAL DA FARMÁCIA DA NATUREZA.....	35
7.2 PLANTAS PROPAGADAS POR SEMENTES CULTIVADAS NO CAMPO DO HORTO MEDICINAL DA FARMÁCIA DA NATUREZA .....	36
7.3 INTRODUÇÃO DE SEMENTES DE <i>Eclipta prostrata</i> IN VITRO, MULTIPLICAÇÃO DE PLANTAS E ACLIMATIZAÇÃO.....	36
7.4 PLANTAS IN VITRO DE <i>Eclipta prostrata</i> CULTIVADAS EM MEIO BASAL WPM E MSM.....	37
7.5 CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	38
7.6 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS OBTIDOS DE CALOS DE <i>Eclipta prostrata</i> EM SUSPENSÃO.....	38
7.7 CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	39
7.8 CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	41
7.9 CULTIVO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO E NO CAMPO.....	43
7.10 CULTIVO DE CLONE Ep5 DE <i>Eclipta prostrata</i> NOS MUNICÍPIOS DO GUARUJÁ E JARDINÓPOLIS.....	45
7.11 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DA PLANTA <i>Eclipta prostrata</i> .....	48
7.12 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DAS ESTRUTURAS ISOLADAS DA CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>Eclipta prostrata</i> .....	49
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A planta medicinal *Eclipta prostrata* L. (Asteraceae) é uma espécie cosmopolita que ocorre amplamente em vários países a exemplo do Brasil, China e Índia. Possui indicação na medicina tradicional destes países para o tratamento de doenças do fígado, como cirrose e hepatite, além de agravos como icterícia. A espécie foi utilizada com sucesso em modelos farmacológicos no tratamento de lesões hepáticas causadas por vírus, medicamentos e esteatose. Os coumestanos wedelolactona e demetilwedelolactona são as principais moléculas relacionadas às ações desta espécie sobre o fígado. Além dessas substâncias, os ésteres formados a partir da esterificação do ácido quínico com uma ou duas moléculas de ácido cafeico (5-O-cafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico) também apresentam ação farmacológica importante como antioxidante e anti-inflamatória.

Apesar do potencial terapêutico dessa espécie, que é utilizada para o tratamento de diversas enfermidades, identificamos duas lacunas de conhecimento em relação à espécie: 1) não há cultivo em larga escala com genótipos selecionadas pelo teor de coumestanos e 2) não há estudos sobre o acúmulo dos ésteres do ácido cafeico em cultura de células em suspensão.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar acessos altamente produtores de wedelolactona e demetilwedelolactona, bem como verificar o acúmulo destas substâncias em plantas cultivadas em condições ambientais diversas. Além de investigar sob condição *in vitro* o acúmulo de coumestanos e de ésteres do ácido cafeico em planta *in vitro* e cultura de células em suspensão.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A ESPÉCIE *Eclipta prostrata*

A espécie *Eclipta prostrata* (L.) L. [Synonym - *Eclipta alba* Hassk], cresce em terrenos úmidos e sombreados de todo mundo tropical (LORENZI; MATOS, 2008) é uma planta medicinal conhecida na Índia como “bringaraja”. É uma das principais plantas utilizadas na medicina Ayurvédica, para atividade hepatoprotetora em formulações para hepatite viral e tóxica, incluindo indicações para icterícia e cirrose (JAHAN et al., 2014). É indicada como antiasmático, anti-helmíntico, antipirético, expectorante, promotora de crescimento capilar, tônico antienvhecimento, tônico neural e no tratamento de doenças de pele (TABASSUM; AGRAWAL, 2004; THAKUR; MENGI, 2005; GHULE et al., 2011).

A presença de luteolina em extratos de *Eclipta prostrata* confere a planta atividade antiepilética (GUENNÉ et al., 2019). Na Medicina Tradicional Chinesa, *Eclipta prostrata* é conhecida como “Han-lian-cao”, sendo usada para tratamento de doenças hepáticas, fibrose pulmonar e no tratamento dos sintomas da menopausa (CAI et al., 2004; CHEN et al., 2011; ZHAO et al., 2015; LI; KAN, 2017). No Brasil, a medicina tradicional registra seu uso em práticas caseiras no combate a asma, bronquite, diarreia, sífilis, tosse, bem como para neutralização de veneno de animais peçonhentos (MATOS, 2000; LORENZI; MATOS, 2008). Além das atividades acima descritas, do ponto de vista etnofarmacológico, a *E. prostrata* é também indicada para o tratamento de doenças respiratórias, o que foi confirmado por estudo pré-clínico realizado por nosso grupo de pesquisa, sendo essa atividade relacionada a presença de coumestanos (MOREL et al., 2017).

Em resumo as principais atividades farmacológicas além das já mencionadas são antiasmática, antimicrobiana e antioxidante (TIMALSINA; DEVKOTA, 2021). As principais classes de substâncias presente na espécie são os coumestanos, com destaque para demetilwedelolactona e wedelolactona (WAGNER et al., 1986), os flavonoides incluindo apigenina, diosmetina, luteolina, luteolina-7-glicosídeo, quercetina e 3'-metil-orobol (LEE et al., 2009; SINGH et al., 2010), as saponinas: ácido echinocystico, eclalbatina e eclalbasaponinas (UPADHAY et al., 2001; LEE et al., 2008; RUSCHEL et al., 2013), os triterpenos: ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido

wedelico,  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (SINGH et al., 2010) os fitoesteróis:  $\beta$ -estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (SINGH et al., 2010) e os ésteres formados pela esterificação de um resíduo de ácido cafeico com um resíduo de ácido quínico, por exemplo o ácido 5-cafeoilquínico (ACQ), ou dois resíduos do ácido cafeico com um de ácido quínico (diACQ), tal como o novo cumestano glicosilado (SEO et al., 2020). Estudos realizados *in silico* usando *docking* molecular mostraram que isômeros de ácidos cafeoilquínico e dicafeoilquínico (ACQ e diACQ) são eficientes no combate a Covid-19 (JOSHI et al., 2020).

Geralmente a efetividade terapêutica dos fitoterápicos depende da diversidade e a complexidade das substâncias presentes no extrato, é o fitocomplexo que deve ser considerado e não uma substância isolada, e em alguns casos é a proporção entre as substâncias que determina o efeito terapêutico. Um trabalho realizado com *E. prostrata* mostrou que a relação de 2:1 entre wedelolactona e demetilwedelolactona que confere atividade farmacológica à espécie a qual é utilizada em vários medicamentos da Medicina Tradicional Chinesa (WANG et al., 2020).

## 2.2 CULTURA DE TECIDOS DE *Eclipta prostrata*

Protocolos de micropropagação de *E. prostrata* tem sido estabelecidos a partir de organogênese direta ou indireta em meio de cultura MS (Murshige; Skoog, 1962) suplementado com regulador vegetal benzilaminopurina (BAP) (DAR et al., 2016) e a maioria dos estudos utiliza como explante o segmento nodal, sendo o enraizamento obtido em meio basal ou em meio basal dividido por dois, com adição de ácido indolbutírico (IBA) ao meio de cultura e a utilização de cloreto de clorocolina que promove aumento no número de raízes produzidas e eleva o nível de clorofila nas folhas (FRANÇA et al., 1995; BORTHAKUR et al., 2000; BASKARAN; JAYABALAN, 2005; RAY; BHATTACHARYA, 2008). Há relatos de protocolo de micropropagação de *Eclipta alba* com a formação de brotações múltiplas obtidas a partir de explantes nodais cultivados em meio MS, suplementado com 4,44  $\mu$ M de BAP (ZAFAR; SAGAR, 1999), e também protocolo para propagação em larga escala altamente eficiente e reprodutível, descrito para essa espécie, realizado a partir de segmentos nodais cultivados em meio MS suplementado com 13,2  $\mu$ m de BAP e 4,6  $\mu$ m de cinetina (DAHKA; NOTHARI, 2005).

A proliferação dos brotos em meio líquido mostrou-se bem sucedida inclusive com aumento da produção de wedelolactona, o que aumentou a perspectiva de produção de coumestanos em biorreator (GAWDE; PARATKON, 2012).

Estudo realizado com marcador molecular RAPD com plantas micropropagadas e a planta doadora de explantes mostraram que não houve variabilidade genética entre os materiais analisados (SINGH et al., 2012).

O efeito de vários fatores físicos e químicos tem sido demonstrado em cultura *in vitro* de *E. prostrata*. A adição de ácido húmico no meio de cultura associado ao BAP e cinetina aumentou a proliferação de brotos (PRAKASH et al., 2015) e calos expostos a luzes monocromáticas multiespectrais em especial a vermelha favoreceu o acúmulo de massa seca e aumentou o teor de  $\beta$ -amirina, demetilwedelolactona, eclalbatina, luteolina e wedelolactona, enquanto a luz azul aumentou o teor de estigmasterol (KHURSHID et al., 2020). A produção de wedelolactona em cultura de células em suspensão foi otimizada em meio líquido MS suplementado com cinetina, metil jasmonato e picloram (RAY; BHATTACHARYA, 2008; SALMA et al., 2018).

O tipo de tecido introduzido *in vitro* para a produção de calos pode interferir na produção de metabolitos secundários. Assim, constatou-se que cultura de calos de *E. prostrata*, obtidos a partir de folha, são excelentes produtoras de cumarina e wedelolactona, enquanto que as culturas geradas a partir de caule produziram mais  $\beta$ -amirina, compostos fenólicos, demetilwedelolactona, eclalbatina e flavonoides (KHURSHID et al., 2018).

O estabelecimento de culturas de calos para regeneração de plantas de *E. alba* constitui uma ferramenta útil para a produção dos coumestanos wedelolactona e demetilwedelolactona. A regeneração de calos produzidos a partir de folha, caule e raiz, cultivados em meio de cultura MS suplementado com várias concentrações de reguladores de crescimento como ácido indol acético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) e cinetina foi relatada por Zafar e Sagar em 1999.

Estudos realizados com diferentes níveis de poliploidia induzidas em plantas mantidas *in vitro* têm demonstrado que alterações no número de cromossomos alteram o teor de princípios ativos. Em plantas tetraploides de *E. prostrata*, obtidas *in vitro* com exposição a colchicina a 0,1% por 24 h, houve uma produção de wedelolactona três vezes superior à das plantas diploides cultivadas *in vitro* ou provenientes de plantas-mãe diplóides *in vivo* (SALMA et al., 2018).

Outros dois aspectos importantes da cultura de tecido que pode viabilizar o cultivo em larga escala são a embriogênese somática e a microencapsulação em alginato de cálcio, por serem técnicas que produzem elevado índice de multiplicação. A embriogênese somática de *E. prostrata* foi obtida a partir de calos friáveis cultivados por três semanas em meio de cultura MS suplementado com ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), com posterior subcultura em MS basal por 4 semanas (DEVENDRA et al., 2011). Também foi desenvolvido para a espécie um protocolo de microencapsulamento em esferas de alginato de cálcio, com 90% de sobrevivência dos segmentos nodais encapsulados (SINGH et al., 2010).

A produção de sementes sintéticas e subsequente regeneração de plantas de *E. alba*, foi relatada usando gemas apicais e segmentos nodais encapsulados (RAY; BHATTACHARYA, 2010). Essa tecnologia de sementes sintéticas tem sido utilizada para troca de germoplasma de genótipos elite e propagação de material vegetal axênico em laboratórios de pesquisa e indústrias farmacêuticas em vários países (DAHKA, 2013).

### 2.3 ESTUDOS AGRONÔMICOS REALIZADOS COM *Eclipta prostrata*

A espécie *E. prostrata* é considerada erva daninha em campos agrícolas, em especial nos arrozais (GOLMOHAMMADI et al., 2018). Diversos herbicidas são utilizados para a eliminação de *E. prostrata* dos campos de cultivo de várias culturas (JORDAN et al., 2009; WANG et al., 2012; GOLMOHAMMADI et al., 2018; SAHA et al., 2019), sendo o diclosulam (N-(2,6-dichlorophenyl)-5-ethoxy-7-fluoro [1,2,4]triazolo [1,5c]pyrimidine-2-sulfonamide) um dos mais utilizados por agir como inibidores da acetolactato sintase (ALS) impedindo a formação dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina (JORDAN et al., 2009).

Assim, experimentos agrícolas são realizados muito mais com a finalidade de descobrir particularidades para eliminar a planta do que para multiplicá-la. Saha et al. 2019, realizaram experimento objetivando controlar a disseminação de sementes de *E. prostrata* e demonstraram que mesmo em solos não férteis a semente germina e a planta cresce atingindo seu estado vegetativo, mas não floresce e conseqüentemente não produz semente e descendentes.

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e ambiente salino interferem na produção de metabolitos secundários e no desenvolvimento de plantas. Estudo realizado com plantas de *E. prostrata* que interagiram com uma mistura de espécies de micorrizas apresentaram incremento na massa seca da parte aérea e houve melhora no desenvolvimento de plantas que foram submetidas a condição de salinidade do solo. Nesse trabalho embora os autores tenham avaliado as principais substâncias ativas presentes na planta como ácido cafeico, ácido 4-O-cafeoilquinico, ácido 5-O-cafeoilquinico, ácido 3,4-O-dicafeoilquinico, ácido 3,5-dicafeoilquinico, ácido 4,5-dicafeoilquinico, ácido férrico, ácido feruloilquinico, luteolina, luteolina-glucosideo, luteolina-7-O-glucosideo, demetilwedelolactona, wedelolactona e quercetina-3-arabinosideo, apenas esta última substância foi efetivamente aumentada com a associação de micorrizas (DUC et al., 2021).

### 3 HIPOTESE

A obtenção de clone elite micropropagado, rico em coumestanos, torna viável o cultivo em larga escala da espécie para a produção de fitoterápicos e as células em suspensão obtidas de raízes de *E. prostrata* são fonte promissora de compostos bioativos.

#### 4 JUSTIFICATIVA

*Eclipta prostrata* é uma relevante planta medicinal por apresentar expressiva atividade farmacológica. É amplamente prescrita pela medicina tradicional e utilizada em programas de fitoterapia no Brasil. Como ainda não há registro de cultivo dessa espécie no país faz-se necessário selecionar genótipos elites e viabilizar o cultivo em larga escala, o que pode contribuir para a padronização do fitoterápico pela confirmada presença dos princípios ativos próprios da espécie.

Além disso, metodologia bem estabelecida de cultura de células de *E. prostrata* pode viabilizar a produção de substâncias bioativas de interesse farmacológicos, de forma contínua, pela ausência de mudanças bruscas de fatores bióticos e abióticos, próprios do cultivo em campo.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar acessos do horto da Farmácia da Natureza produtores de wedelolactona e demetilwedelolactona, bem como verificar o acúmulo destas substâncias em plantas cultivadas sob diversas condições ambientais. Além de investigar sob condição *in vitro* o acúmulo de coumestanos e de ésteres do ácido cafeico em planta *in vitro* e cultura de células em suspensão.

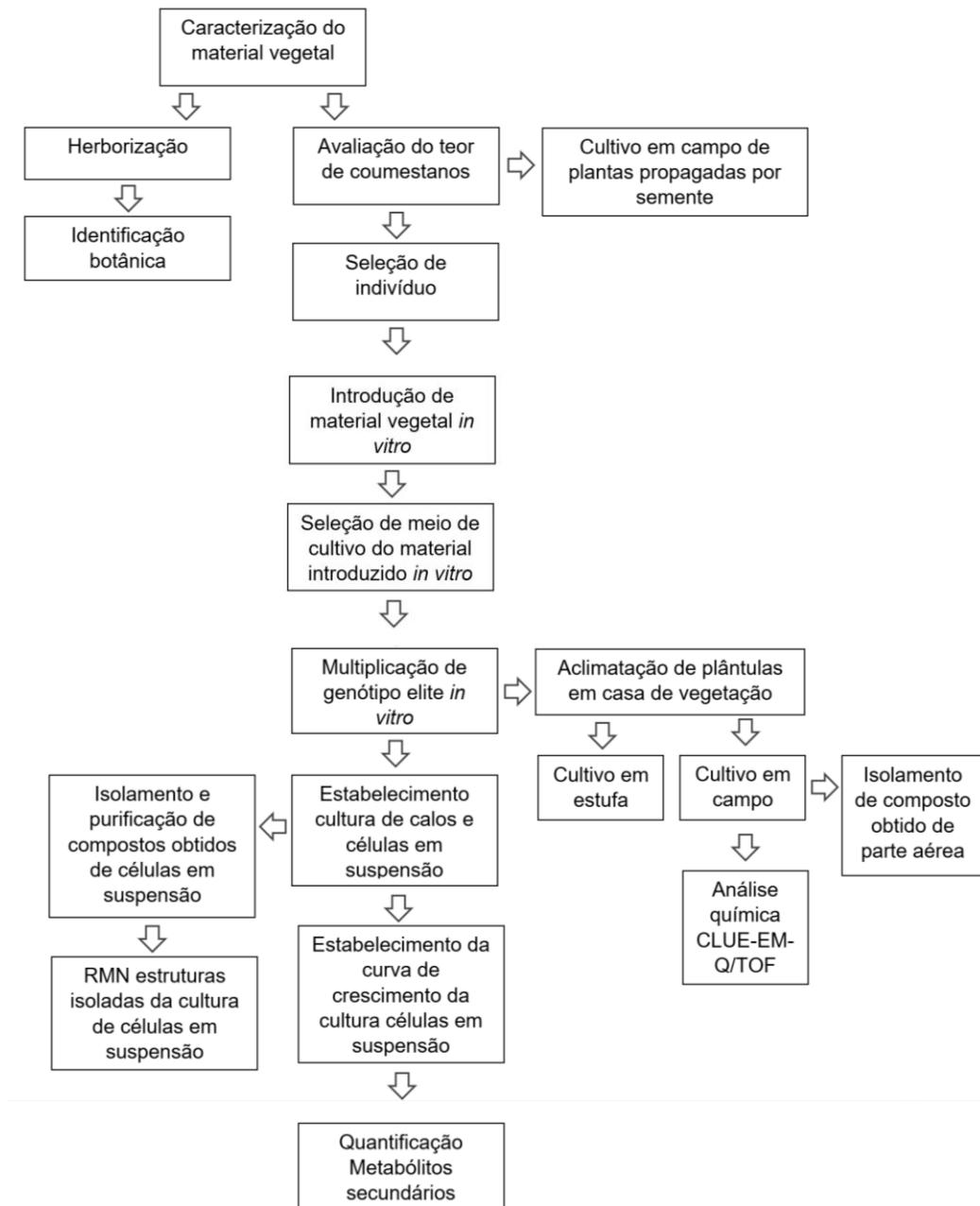
### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o teor de coumestanos em indivíduos mantidos na coleção do Horto medicinal da Farmácia da Natureza;
- Introduzir *E. prostrata in vitro*, micropropagar plantas e produzir calos;
- Estabelecer a cultura de células em suspensão a partir dos calos provenientes de raiz de *E. prostrata*;
- Determinar a curva de crescimento e avaliar a produção de ésteres de ácidos cafeoilquínicos e coumestanos, nessa cultura de células;
- Avaliar o cultivo de *E. prostrata* em ambiente de casa de vegetação, em telado de sombrite e em campo de cultivo;
- Avaliar a influencia das condições edafoclimáticas do cultivo do genótipo selecionado em duas localidades Jardinópolis/SP e no Guarujá/SP;
- Análise química de ésteres de ácidos cafeicos e coumestanos em CLAE e CLUE-EM-Q/TOF;
- Identificar por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  as substâncias isoladas dos calos de *E. prostrata*.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 ESTRATÉGIA DE TRABALHO

**Figura 1** – Fluxograma de etapas realizadas durante a execução do trabalho.



## 6.2 MATERIAL VEGETAL

A espécie *Eclipta prostrata* utilizada em todos os experimentos aqui descritos foi identificada pelo Dr. Aristônio Magalhães Teles do Departamento de Botânica, ICB, UFG. Um voucher da espécie foi depositado no herbário da UNAERP (HPMURP 1032).

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen (nº do cadastro AC47B22).

## 6.3 AVALIAÇÃO DO TEOR DE COUMESTANOS EM INDIVÍDUOS MANTIDOS NA COLEÇÃO DO HORTO MEDICINAL DA FARMÁCIA DA NATUREZA

Partes aéreas de dez indivíduos (Ep1, Ep2...Ep10) foram selecionados na coleção do horto medicinal da Farmácia da Natureza, em seguida foram secos em estufa de secagem com circulação de ar (Marconi MA035/5/10P) por 2 dias a temperatura de 45°C. Após esse período todo material foi moído separadamente em moinho de faca (Marconi MA048) até a granulometria de 40 mesh. O material foi armazenado em freezer e posteriormente analisado por CLAE.

## 6.4 CULTIVO DE PLANTAS PROPAGADAS EM VIVEIRO E NO CAMPO

Posteriormente, foi realizado outro experimento com plantas propagadas a partir de sementes advindas dos dez genótipos da coleção de plantas medicinais da Farmácia da Natureza. As sementes foram colocadas em substrato Carolina® em bandejas de 98 poços e após 30 dias da germinação as plantas foram transferidas para saco plástico contendo solo, areia e esterco na proporção 3:2:1 e mantidos na casa de vegetação por 15 dias, após esse período as mudas foram plantadas no campo com espaçamento de 25 x 25 cm e irrigadas diariamente. A parte aérea foi colhida 90 dias após o plantio. O material foi seco em estufa com circulação de ar circulante a 45 °C por 2 dias e analisado quanto ao peso seco e teor de coumestanos.

A preparação dos extratos foi realizada em triplicata com 200 mg de cada amostra. Ao material vegetal seco e pulverizado foram adicionados 5 mL de

etanol:água (8:2), com permanência de 30 minutos no ultrassom (Eco-Sonics Q 3.0/25). Posteriormente o material foi filtrado e o solvente seco com ventilação forçada. Os extratos secos foram acondicionados em freezer até a análise em CLAE.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à ANOVA através do programa SISVAR V.5.1 (FERREIRA, 2005), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância (SCOTT-KNOTT, 1974).

## 6.5 INTRODUÇÃO DE SEMENTES DE *Eclipta prostrata* IN VITRO E SELEÇÃO DE INDIVÍDUO ELITE

As sementes do genótipo Ep5 foram coletadas e armazenadas em um envelope de papel de filtro, o qual foi acondicionado em frascos contendo solução de Cercobin a 2% (p/v) por 24 horas em mesa agitadora, posteriormente foi transferido para solução de hipoclorito de sódio a 1% por 20 minutos, após esse processo todo o hipoclorito foi esgotado e adicionado o álcool 70% por 1 minuto em seguida o material foi lavado 3 vezes com água destilada e autoclavada. A inoculação foi realizada em meio de cultura Wood Plant (WP) (McCOWN; LLOYD, 1981) contendo 20 g/L de sacarose e 2,5 g/L de Gellex em frasco de 7 cm de comprimento da parte aérea por 5 cm de diâmetro. Foram inoculadas 100 sementes, distribuídas em 10 frascos contendo 10 sementes cada. Após 20 dias as sementes começaram a germinar.

As plantas *in vitro* foram individualizadas e transferidas para frascos tipo cubeta (8 cm de comprimento da parte aérea por 2,5 cm de diâmetro) contendo meio WP semissólido suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,5 g L<sup>-1</sup> de agente gelificante Gellex®.

Após 30 dias, uma planta *in vitro* foi selecionada, por apresentar maior comprimento da parte aérea e maior número de folhas, sendo considerada a mais vigorosa; seus segmentos nodais foram transferidos para cubetas contendo meio de cultura WP.

Todos os experimentos realizados *in vitro* foram conduzidos em sala de crescimento a 25 ± 2°C, com 55 - 60% de umidade relativa, além do controle de fotoperíodo; 16 h de luz e 8 h em ausência de luz.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à ANOVA através do programa SISVAR V.5.1 (FERREIRA, 2005), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância (SCOTT-KNOTT, 1974).

#### 6.6 PLANTAS *IN VITRO* DE *Eclipta prostrata* CULTIVADAS EM MEIO BASAL WP E MS

Segmentos nodais de genótipo elite micropropagado em WP, foram introduzidos em meios de cultura basal MS e WP semissólidos suplementados com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,5 g L<sup>-1</sup> de agente gelificante Gellex®.

Os frascos utilizados nesse experimento foram do tipo cubeta. As plantas permaneceram nesses meios por 60 dias e posteriormente foram medidos a comprimento da parte aérea da planta e o comprimento da raiz. Após secagem em estufa como descrito no item 6.3 foram registrados peso seco da parte aérea e da raiz, os extratos foram preparados e os teores de wedelolactona e demetilwedelolactona foram quantificados em CLAE.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à ANOVA através do programa SISVAR V.5.1 (FERREIRA, 2005), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância (SCOTT-KNOTT, 1974).

#### 6.7 MULTIPLICAÇÃO DE PLANTA DE *Eclipta prostrata* *IN VITRO*

O indivíduo selecionado foi repicado a cada 30 dias até a obtenção de 800 plantas *in vitro* as quais foram utilizadas nos experimentos de campo e na produção de calos e cultura de células em suspensão.

## 6.8 ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Eclipta prostrata* IN VITRO

As plantas *in vitro* mantidas por 60 dias consecutivos em meio de cultura WP com sistema radicular desenvolvido foram transferidas para copo plástico de 150 mL, contendo 70 g de substrato comercial Carolina® e aclimatadas em casa de vegetação aclimatizada com temperatura de 27°C, umidade de 70% e irrigação por micro aspersão realizada 3 vezes ao dia por 5 minutos. As plantas permaneceram neste ambiente por 45 dias.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à ANOVA através do programa SISVAR V.5.1 (FERREIRA, 2005), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância (SCOTT-KNOTT, 1974).

## 6.9 CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO

As raízes foram segmentadas de plantas desenvolvidas em meio basal WP semi-sólido e transferidas para o mesmo meio (WP), desta vez suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA), 20 g/L de sacarose e pH 6,0. Após 60 dias consecutivos no referido meio houve a formação de calos, que foram subcultivados de 30 em 30 dias, por seis meses, e após a obtenção de calos friáveis, foi realizada a cultura em suspensão no mesmo meio, sem adição de Gellex®.

## 6.10 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS OBTIDOS DE CALOS DE *Eclipta prostrata*

Trezentos e dezenove gramas de calos de *Eclipta* foram secos em liofilizador e extraídos com 900 mL de etanol:água (8:2), por maceração em ultrassom por 45 minutos. A extração foi realizada 3 vezes com o referido solvente, o extrato foi filtrado, rotaevaporado e liofilizado. Nove gramas do extrato foi aplicado em uma coluna C-18, 6 cm de comprimento da parte aérea e 3 cm de diâmetro, ativada previamente, e a eluição foi feita inicialmente com 100 mL de água, posteriormente foi adicionado na coluna 100 mL do eluente metanol:água (1:1) que após rotaevaporado e liofilizado

resultou na Fração 2; por fim a coluna foi eluída com, 100 mL de, metanol e após rotaevaporação do solvente resultou na Fração 3.

A fração 2 foi diluída em etanol:água (80:20) e foi aplicada em uma coluna de sephadex LH-20, com comprimento da parte aérea 22,0 cm e diâmetro de 3,0 cm. A fase móvel utilizada foi etanol:água (80:20). Foram obtidas duas frações a primeira rica em clorofila e a segunda denominada EC contendo coumestanos e os ésteres de ácido cafeico.

#### 6.11 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS OBTIDOS DE CALOS DE *Eclipta prostrata*

A fração EC foi submetida a purificação em CLAE preparativo Shimadzu (Kyoto, Japan), equipamento equipado com LC-20 AP, injetor manual e detector UV-Visível SPD-20A com interface CBM-20A, degaseificador DGU-20A5 e coluna Shimadzu preparativa LC18 ODS(L) (50 × 25 cm × 5 µm, 100 Å). Fase móvel foi gradiente 30% MeOH a 100% MeOH (0-180 minutos) e gradiente de 100 à 30 entre 180.01 – 185 minutos, mantendo-se isocrático a 10% MeOH até 210 minutos, com fluxo de 20,0 mL.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 2 mL da fração purificada (2,1 g.mL<sup>-1</sup>); a detecção foi conduzida a 350 nm.

Após o isolamento de três substâncias a verificação de pureza foi realizada em CLAE analítico, em aparelho Shimadzu (Kyoto, Japan), equipamento equipado com LC-20 AT, auto injetor SIL- 20A e detector de arranjo de fotodiodo SPD-M 20A com interface CBM-20A, degaseificador DGU- 20A 3 e coluna Phenomenex Luna C18 (250 mm × 4.6 mm × 5 µm, 100 Å). Fase móvel (Metanol:água) modo gradiente 10% a 66% MeOH (0 a 32 minutos) e gradiente de 66 à 10 entre 32.01 – 35 minutos, mantendo-se isocrático a 10% MeOH até 45 minutos, com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL e a detecção foi realizada a 350 nm.

As substâncias, inicialmente denominadas A, B e C foram submetidas a identificação utilizando-se métodos espectroscópicos.

## 6.12 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DAS ESTRUTURAS ISOLADAS DA CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

A identificação das substâncias isoladas foram realizadas por análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados de literatura utilizando  $\text{CH}_3\text{OD}$  como solvente. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Bruker DPX 500 operando a 500 MHz na frequência do  $^1\text{H}$  e a 125 MHz na frequência do  $^{13}\text{C}$ , localizado no Departamento de Química da FFCLRP-USP.

## 6.13 ESTABELECIMENTO DE CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *Eclipta prostrata*

Para o estabelecimento da curva de crescimento das células em suspensão foram pesados  $0,3 \pm 0,01$  g de células e inoculadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio WP líquido com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, suplementado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. O pH foi ajustado para  $6,00 \pm 0,05$  e os erlenmeyers foram mantidos em agitador orbital a 90 rpm em sala de crescimento de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em condição de fotoperíodo, com luminosidade de  $70 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições em triplicata, totalizando 9 frascos por ponto de coleta.

A coleta do material foi realizada a partir do dia inicial de cultivo (tempo zero) até o sexagésimo dia. Com intervalo de cinco dias, entre cada ponto de coleta, as células foram retiradas do meio de cultura, pesadas e secas em estufa de ar circulante por 48 horas a  $45^\circ\text{C}$ .

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à ANOVA através do programa SISVAR V.5.1 (FERREIRA, 2005), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância (SCOTT-KNOTT, 1974).

#### 6.14 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS E QUANTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS DE INTERESSE EM CLAE

As amostras secas foram pesadas separadamente (100 mg), submetidas a extração com 2 mL de metanol e mantidas em ultrassom por 30 minutos. Após filtração foram analisadas em CLAE.

As análises foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência analítico LC-10ADVP (Shimadzu, Japão) acoplado a uma coluna Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$  Phenomenex) e detector de arranjo diodo SPD-M10A. Como fase móvel foi utilizado em água + ácido acético 0,1% (A) e metanol (B), utilizando o seguinte sistema de solventes: de 10-66% B (0 até 32 minutos); de 66-10% B (32 até 35 minutos); 10% B (35 até 40 minutos); com vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas em triplicata e o volume de injeção foi 20  $\mu$ L, o comprimento de onda utilizado foi 350 nm para ambos os coumestanos.

Para a quantificação dos metabólitos, wedelolactona, demetilwedelolactona e dos ésteres do ácido cafeico, foram utilizados os padrões isolados e caracterizados nesse trabalho, solubilizados em metanol e analisados por CLAE analítico. Foram realizadas curvas de quantificação dos coumestanos wedelolactona e demetilwedelolactona e dos ésteres, ácido 5-O-cafeoilquínico e ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,91 e 1,95;  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, o experimento foi realizado em triplicata. A curva de calibração resultante, bem como, os limites de quantificação e de detecção para cada um desses compostos encontra-se descrito nos APENDICES B, C, D e E.

#### 6.15 CULTIVO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS EM ESTUFA E NO CAMPO

Plantas micropropagadas aclimatizadas em fevereiro de 2020, conforme descrito no item 6.8, foram mantidas em potes com substrato Carolina® 30 dias até atingir comprimento da parte aérea entre 30 e 45 cm. Nesse experimento foi utilizado quatro plantas com três repetições totalizando 12 plantas por tratamento. Decorrido o período experimental, essas plantas *in vitro* foram avaliadas quanto a comprimento da parte aérea, em seguida foram secas como descrito no item 6.3 e pesadas as partes aéreas e raízes, separadamente (Figura 2).

**Figura 2** - Planta *in vitro* retirada do meio de cultura e lavada em água corrente (A e B), planta *in vitro* transferida para copo plástico com substrato (C), planta *in vitro* na casa de vegetação (D), planta *in vitro* com 30 e 45 cm crescidas na casa de vegetação (E) e plantio no campo (F).



O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à ANOVA através do programa SISVAR V.5.1 (FERREIRA, 2005), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância (SCOTT-KNOTT, 1974).

Posteriormente, foram preparados extratos para quantificação dos coumestanos em CLAE, conforme descrito em item 6.14.

As plantas mantidas na casa de vegetação climatizada, com umidade de  $67 \pm 3\%$  e temperatura controlada de  $27 \pm 3^\circ\text{C}$ , por 45 dias, com 45 cm de comprimento da parte aérea, foram transferidas para área de cultivo, em março de 2020, no horto medicinal da Farmácia da Natureza em Jardinópolis. Foram abertas covas de 20 cm de largura e 20 de profundidade e as mudas foram plantadas em espaçamento 30 x 30 cm, a irrigação foi realizada diariamente, por aspersor ligado automaticamente as 10:00 e 16:00 horas. Foram plantadas três linhas com 30 plantas cada. As plantas foram colhidas 30 dias após o plantio, foram avaliadas quanto a comprimento da parte aérea, secas como descrito no item 6.3. e pesadas as partes aéreas e raízes, separadamente. Os extratos foram preparados para a quantificação dos coumestanos em CLAE.

## 6.16 CULTIVO DO CLONE Ep5 DE *Eclipta prostrata* NOS MUNICÍPIOS DO GUARUJÁ E JARDINÓPOLIS

As plantas utilizadas nesse experimento foram micropropagadas, aclimatizadas como descrito no item 6.15. Após aclimatização as mudas foram transplantadas para vasos de 1L contendo solo, esterco e areia, na proporção de

3:2:1. Após 15 dias as plantas foram alocadas no solo de dois municípios: Guarujá e Jardinópolis (SP), cuja análises de macro e micronutrientes encontra-se nos ANEXOS 11 e 12, respectivamente.

O experimento foi realizado entre os meses de fevereiro e março de 2021. Em ambos os locais as plantas foram mantidas em ambiente com sombrite 20% de sombra e foram irrigadas uma vez ao dia. Foram utilizadas quatro plantas e quatro repetições totalizando 16 plantas por tratamento.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à ANOVA através do programa SISVAR V.5.1 (FERREIRA, 2005), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância (SCOTT-KNOTT, 1974).

As plantas foram mantidas por três meses nesses ambientes e posteriormente avaliadas quanto a comprimento da parte aérea da planta e peso fresco, em seguida foram secas como descrito no item 6.3. Foram registrados os pesos secos e após preparação dos extratos foram determinados os teores de wedelolactona e demetilwedelolactona.

Os dados meteorológicos de Jardinópolis foram coletados no site Agritempo (<https://www.agritempo.gov.br>) e os do Guarujá na estação meteorologia de São Vicente. Os dados de geoposicionamento (GPS) são: 21°04'12.50"S, 47°44'08.00"O e 552 m de altitude para o cultivo em Jardinópolis e 23°58'37.43"S, 46°13'15.37"O e altitude de 9 m no Guarujá.

#### 6.17 ANÁLISE QUÍMICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Eclipta prostrata* CULTIVADA EM JARDINÓPOLIS E GUARUJÁ EM CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA ALTA EFICIÊNCIA (CLUE-EM-Q/TOF)

A análise dos extratos obtidos foi realizada por CLUE-EM-Q/TOF usando um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (Nexera X2, Shimadzu-Kyoto, HO, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa TripleTOF5600+ (Sciex-Foster, CA, EUA) equipado com um spray de íons Turbo-V. A separação dos compostos foi realizada usando uma coluna Acquity XSelect HSS T3 (2,1 x 150 mm, 2,5 µm ID, Waters), fase móvel composta por água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (Fase móvel A) e acetonitrila (ACN) (Fase móvel B), e o seguinte programa de gradiente: 0,0 min,

10% de B; 1–21 min, 90% de B; 21–25 min, 90% de B; 25,1–33,0 min, 10% de B. A taxa de fluxo foi ajustada em  $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , a temperatura da coluna em  $40^\circ\text{C}$  e o amostrador automático em  $4^\circ\text{C}$ . Cinco microlitros da amostra ( $n=3$ ) foram injetados para cada análise no modo de ionização por eletropulverização negativa (ESI). As condições de operação do MS foram as seguintes: voltagem capilar ajustada em 4500 V no modo de íons negativos; pressão do nebulizador a 55 psi; pressão do gás de secagem a 50 psi; a temperatura do gás a  $550^\circ\text{C}$ ; gás de cortina a 35 (unidades arbitrárias); e potencial de desagrupamento a 80 V. Os métodos de espectrometria de massa de tempo de voo (TOF MS) e aquisição dependente de informação (IDA) foram usados simultaneamente para registrar os espectros de MS e MS/MS. Este método compreende um experimento de levantamento TOF MS com uma faixa de massa de  $m/z$  50 a 1200 e, em paralelo, espectros de íons de produto (PI) para os oito íons mais intensos coletados de  $m/z$  50 a 1200. A energia de colisão foi definida a 35 V com uma propagação de energia de colisão (CE) de  $\pm 20$  V. Portanto, fragmentos de baixa e alta energia foram registrados em um único espectro. Os espectros PI foram obtidos usando o modo de alta sensibilidade e subtração dinâmica de fundo. A calibração em massa do instrumento foi realizada usando um sistema automatizado de entrega de calibração (CDS) a cada cinco injeções, usando uma solução de calibração negativa (AB SCIEX, Concord, ON, Canadá). Antes das injeções em CLUE-EM-Q/TOF, as amostras foram diluídas dez vezes com metanol grau HPLC e filtradas através de um filtro de Nylon de  $0,22 \mu\text{m}$ . As análises foram realizadas pela Dra. Tanize Acunha no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas dentro da plataforma da FCFRP-USP (CEQIL).

Para o processamento de dados, os dados brutos adquiridos a partir das análises por CLUE-EM-Q/TOF foram convertidos para o formato ABF usando o conversor ABF. Então, MS DIAL (v. 4.7) foi usado para detecção de pico, deconvolução e alinhamento. A matriz de dados resultante foi submetida ao MetaboAnalyst 4.0 e submetida à normalização, transformação logarítmica e centralização média. Em seguida, foi realizada análise estatística univariada por teste  $t$  (correção FDR;  $p \leq 0,05$ ) e análise de mapa de calor. A identificação da estrutura do metabólito foi obtida usando a correspondência de dados MS-FINDER e “MSMS-Public-Neg-VS11.msp”.

## 6.18 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DA PLANTA *Eclipta prostrata*

Para o isolamento de coumestanos foi utilizado 4,14 kg de parte aérea da planta a qual foi submetida a maceração estática por 5 dias com 12 L de etanol:água (8:2). Após este período o material foi filtrado e o solvente rotaveaporado até a retirada completa do etanol. Quinze gramas, do extrato resultante (770 g), foram aplicados a uma coluna de sephadex LH-20 com diâmetro de 3,5 cm e 22 cm de comprimento da parte aérea e fracionado com 600 mL de etanol:água (8:2), fase móvel. Na Tabela 1 estão demonstrados os volumes das frações coletadas.

**Tabela 1** - Frações coletadas a partir da eluição de extrato em coluna de sephadex LH-20

Frações coletadas	Volume
PA.1	100 mL
PA.2	30 mL
PA.3	100 mL
PA.4	100 mL
PA.5	200 mL
Volume morto	70 mL

Todas as frações foram analisadas em CLAE tendo como padrão referência de injeção o coumestano wedelolactona. A fração PA.4, por conter coumestanos, foi rotaveaporada até ficar com massa seca. Esta fração concentrada, foi submetida a nova coluna de sephadex LH-20 com diâmetro de 3,5 cm e 22 cm de comprimento da parte aérea e fracionado com 60 mL de etanol:água (8:2), fase móvel. Na Tabela 2 estão demonstrados os volumes coletados em cada fração.

**Tabela 2** - Frações coletadas a partir da eluição de extrato em coluna de sephadex LH-20.

Fração recolhida	Volume
PA.4.0	10 mL
PA.4.1	10 mL
PA.4.2	10 mL
PA.4.3	10 mL
Volume morto	20 mL

A fração PA4.3, rica em coumestanos, foi purificada em CLAE preparativo Shimadzu (Kyoto, Japan), equipamento equipado com LC-20 AP, injetor manual e detector UV-Visível SPD-20A com interface CBM-20A, degaseificador DGU- 20A 5 e coluna Shimadzu preparativa LC18 ODS(L) (50 × 25 cm × 5 µm, 100 Å). Fase móvel foi gradiente 5% MeOH a 20% MeOH (0-40 minutos), isocrático 20% (10min),

gradiente 20% MeOH a 50% (10.01 a 55min), isocrático 50% (55.01 a 65.0min), gradiente 50% MeOH a 80% (65.01 a 70min), isocrático 80% (70.01 a 80.0min), gradiente 80% a 100% (80.01 a 85 min), isocrático 100% (85.01 a 90 min) e gradiente de 100% à 5% (90.01 a 95 min), mantendo-se isocrático a 5% MeOH até 100 minutos, com fluxo de 10,0 mL.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 2 mL e comprimento de onda foi de 350 nm. As substâncias isoladas identificadas por métodos espectroscópicos.

## 7 RESULTADOS E DISCUSÃO

### 7.1 AVALIAÇÃO DO TEOR DE COUMESTANOS EM INDIVÍDUOS MANTIDOS NA COLEÇÃO DO HORTO MEDICINAL DA FARMÁCIA DA NATUREZA

A quantificação de coumestanos nos dez genótipos do Horto da Farmácia da Natureza mostrou que todos os indivíduos apresentaram wedelolactona e três não acumularam demetilwedololactona em níveis quantificáveis, mostrando que entre esses genótipos há uma considerável diferença no teor dessas substâncias (Tabela 3). Dois genótipos se destacaram o Ep4 por apresentar o maior teor de wedelolactona e médio teor de demetilwedelolactona e o Ep5 por mostrar a menor relação entre os cumestamos (9:1). O genótipo Ep5 foi o escolhido para a retirada de semente por apresentar essa relação considerando que no trabalho realizado por Wang e colaboradores, na China, com *E. prostrata* mostrou que a relação de 2:1 entre wedelolactona e demetilwedelolactona foi considerada a mais adequada para conferir atividade farmacológica à espécie, a qual é utilizada em vários medicamentos da Medicina Tradicional Chinesa (WANG et al., 2020).

**Tabela 3** - Teor de wedelolactona e demetilwedololactona de genótipos mantidos na coleção do Horto medicinal da Farmácia da Natureza.

Genótipos	Wedelolactona (mg g <sup>-1</sup> de PS)	Demetilwedelactona (mg g <sup>-1</sup> de PS)	Relação entre Wedelolactona/ Demetilwedelactona
Ep1	1,40j	0,10d	14:1
Ep2	3,40c	0,20b	17:1
Ep3	3,10d	0,20b	15:1
Ep4	3,90a	0,14c	28:1
Ep5	2,80e	0,30a	9:1
Ep6	3,60b	0,17c	21:1
Ep7	2,60f	0,00e	-
Ep8	1,70i	0,00e	-
Ep9	1,90h	0,00e	-
Ep10	2,20g	0,10d	22:1
CV (%)	0,91	17,43	

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

## 7.2 PLANTAS PROPAGADAS POR SEMENTES CULTIVADAS NO CAMPO DO HORTO MEDICINAL DA FARMÁCIA DA NATUREZA

Plantas cultivadas por 90 dias no campo produziram  $30,1 \pm 2,7$  g de parte aérea seca por planta e teor de wedelolactona foi de  $3,00 \text{ mg g}^{-1}$  de PS e de demetilwedelolactona foi de  $1,10 \text{ mg g}^{-1}$  de PS. A relação entre o teor dos dois coumestanos foi de 3:1, que está próxima da relação considerada adequada para obtenção de fitoterápico de *Eclipta* que é 2:1, proposta por Wang et al. (2020). Nesse experimento a produtividade foi de 3,4 Ton/ha, mais de cinco vezes superior ao obtido no experimento colhido com 30 dias de cultivo, mostrando que a planta necessita mesmo permanecer no campo por no mínimo três meses.

*Eclipta prostrata* é extensivamente plantada na Índia, em especial no sul do país no estado de Karnataka, onde a produtividade varia de 3 a 8 Ton/ha dependendo da época do ano (BINDU; ROHINI, 2020).

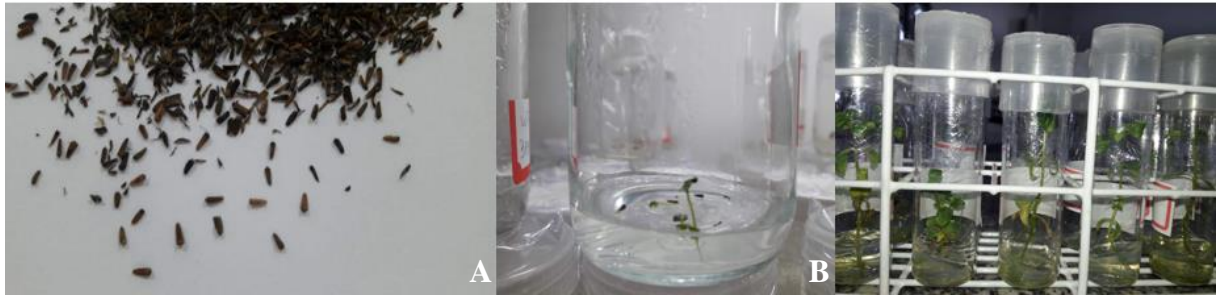
## 7.3 INTRODUÇÃO DE SEMENTES DE *Eclipta prostrata* IN VITRO, MULTIPLICAÇÃO DE PLANTAS IN VITRO E ACLIMATIZAÇÃO

O processo de assepsia das sementes foi eficiente. Das cem sementes inoculadas, 54 germinaram e 100 % das sementes permaneceram isentas de contaminação.

Das plantas *in vitro* individualizadas em cubeta, selecionou-se os 20 indivíduos mais altos para manutenção e monitoramento em sala de crescimento (Figura 3).

Após 30 dias de cultivo, o clone elite foi definido por apresentar comprimento da parte aérea de 8 cm, 15 folhas e 7 segmentos nodais, sendo o indivíduo mais vigoroso dentre os vinte selecionados anteriormente.

**Figura 3** - Estabelecimento de acessos de *Eclipta prostrata in vitro*. Sementes submetidas a assepsia (A), germinação de semente introduzida (B) e estabelecimento de plantas *in vitro* (C).



#### 7.4 PLANTAS *IN VITRO* DE *Eclipta prostrata* CULTIVADAS EM MEIO BASAL WP E MS

A grande maioria dos trabalhos com cultura de células de *E. prostrata* descritos na literatura foram realizados com explantes folha ou caule, em meio de cultura MS (RAY; BHATTACHARYA, 2008; KHURSHID et al., 2018; SALMA et al., 2018; KHURSHID et al., 2020). Em razão disso, foi estruturado um experimento que comparou o efeito do meio de cultura MS e WP no desenvolvimento de plantas *in vitro* teor de coumestanos e foi demonstrado que o WP promoveu maior acúmulo de massa seca das raízes e maior teor de demetilwedelolactona (Tabelas 4 e 5), a qual é a substância predominante nas raízes cultivadas *ex vitro*. Em função desse resultado optou-se por estabelecer a cultura de células, a partir das raízes, em meio WP.

**Tabela 4** - Efeito dos meios de cultura MS e WP no comprimento da parte aérea da planta *in vitro*, comprimento da raiz, peso seco da parte aérea e raiz de plantas cultivadas *in vitro* de *Eclipta prostrata*.

Meio de cultura	Comprimento da parte aérea da planta <i>in vitro</i> (cm)	Comprimento Raiz* (cm)	Peso seco Parte aérea (mg)	Peso seco Raiz (g)
WP	5,22 a	6,00 a	10,10 a	3,30 a
MS	5,62 a	3,25 a	9,31 a	0,27 b
CV(%)	19,15	33,54	26,92	55,76

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

**Tabela 5** - Efeito do meio MS e WP no teor de wedelolactona e demetilwedelolactona na parte aérea e raiz de plantas *in vitro* de *Eclipta prostrata*.

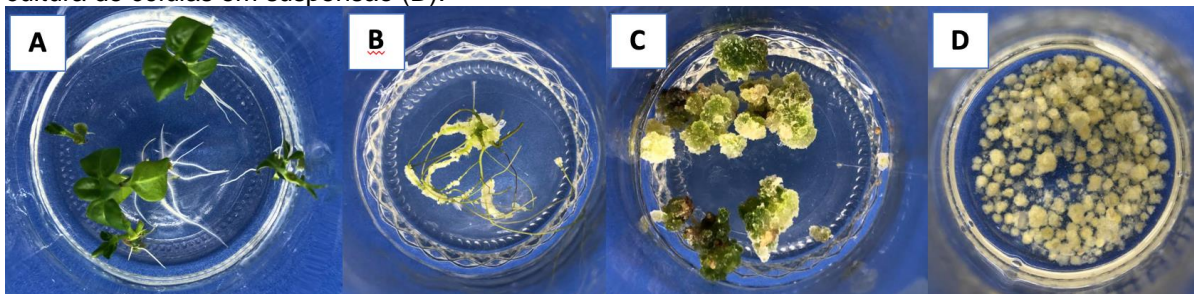
Meio de cultura / material <i>in vitro</i>	Wedelolactona mg g <sup>-1</sup> de PS	Demetilwedelolactona mg g <sup>-1</sup> de PS
MS / Parte aérea	1,52 a	0,00 b
WP / Parte aérea	0,92 a	0,73 a
CV (%)	1,71	0,84
MS / Raiz	0,27 a	0,33 b
WP / Raiz	0,00 b	0,58 a
CV (%)	5,24	7,32

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

## 7.5 CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO

Após 60 dias de cultivo em meio WP semissólido suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, das raízes segmentadas do clone *Ep5*, houve a formação de calos, que foram subcultivados de 30 em 30 dias, por seis meses, e após a obtenção de calos friáveis, foi realizada a cultura em suspensão no mesmo meio, sem adição de Gellex<sup>®</sup> (Figura 4).

**Figura 4** - Planta de *E. prostrata* cultivadas *in vitro* (A), raízes gerando calos (B) calos formados (C) e cultura de células em suspensão (D).



## 7.6 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS OBTIDOS DE CALOS DE *Eclipta prostrata* EM SUSPENSÃO

Do extrato proveniente dos 319 g dos calos de *Eclipta prostrata* obteve-se massa de 9,00 g. A purificação realizada resultou em três frações, de massas 5,14 g, 2,13 g e 0,16 g, para as frações 1, 2 e 3, respectivamente.

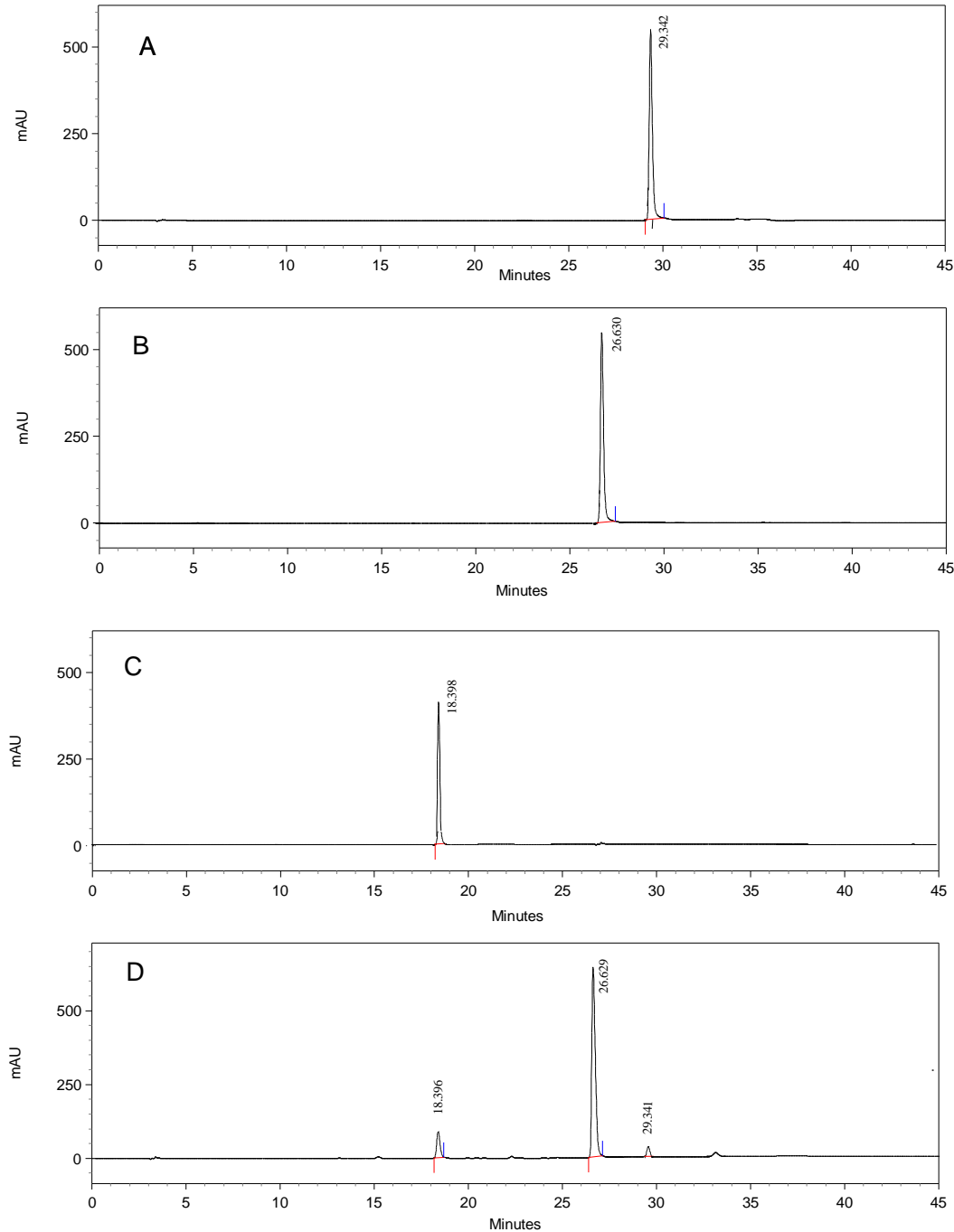
A purificação da fração 2 de massa 2,13 g gerou duas frações a primeira rica em clorofila e a segunda denominada EC contendo coumestanos e os ésteres de ácido cafeoilquínico (EC = 2,00g).

A fração EC purificada em CLAE preparativo, gerou compostos purificados com massas de 10, 19 e 8 mg, que foram inicialmente identificados como A, B e C; e posteriormente identificados como: wedelolactona, 3,5-dicafeoil-*epi*quínico e 5-O-cafeoilquínico, respectivamente.

## 7.7 CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO

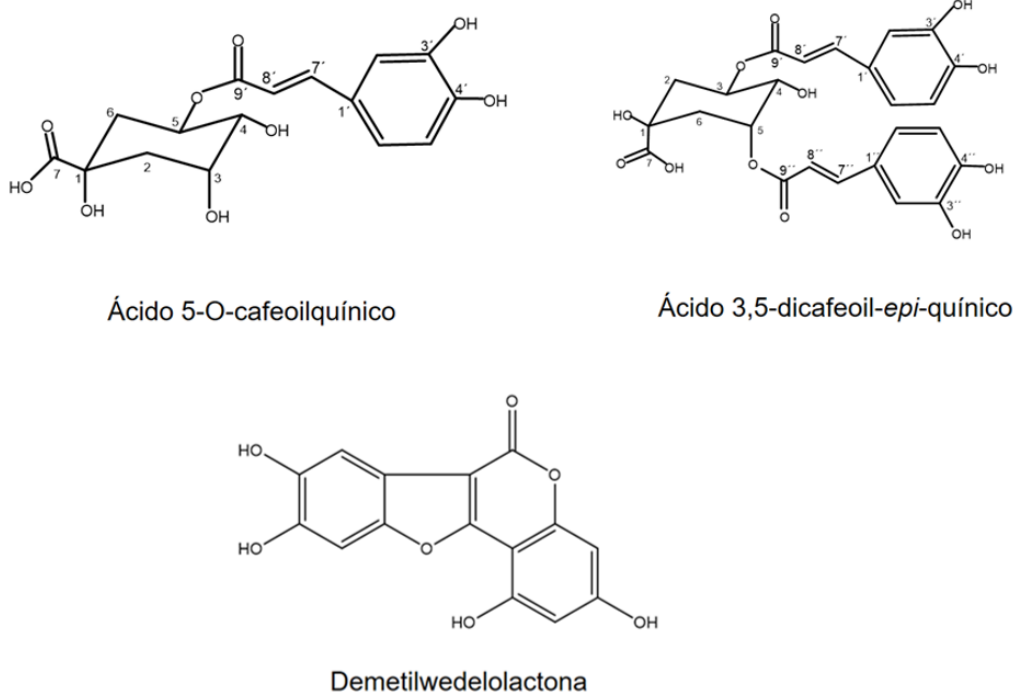
As análises em CLAE das células em suspensão de *E. prostrata*, cultivadas por 60 dias *in vitro*, evidenciaram que as mesmas produziram concentrações variadas de demetilwedelolactona e dos ácidos 5-O-cafeoilquínico e ácido 3,5-dicafeoil-*epi*quínico sendo esse último a substância majoritária (Figura 5).

**Figura 5** – Cromatograma das soluções químicas de referência wedelolactona (A), ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico (B), ácido 5-O-cafeoilquínico (C) e perfil cromatográfico de extrato obtido de células em suspensão, fração denominada EC cultivadas por 45 dias (D), em  $\lambda = 350$  nm.



As células em suspensão produziram como substância majoritária o ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico, relatado pela primeira vez em cultura de tecido de *E. prostrata*, seguida da produção de ácido 5-O-cafeoilquínico e de demetilwedelolactona, sendo estas substâncias, apresentadas na Figura 5 e sido confirmadas por RMN (Figura 6).

**Figura 6** - Substâncias isoladas de calos e células em suspensão de *Eclipta prostrata* e identificadas por métodos espectroscópicos.



## 7.8 CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

A curva de crescimento mostrou que a produção de biomassa que começou com 0,05 g de peso seco e aumentou em mais de 11,2 vezes com 25 dias (0,56 g) de cultura e atingiu o maior acúmulo aos 35 dias (2,91 g), o que representou aumento de 58,2 vezes em relação à massa de inóculo inicial empregada. Após o trigésimo quinto dia ocorreu um declínio e entre os dias 40 e 55 nota-se uma estabilidade no crescimento e em 60 dias, ocorreu o declínio na curva de crescimento (Figura 7).

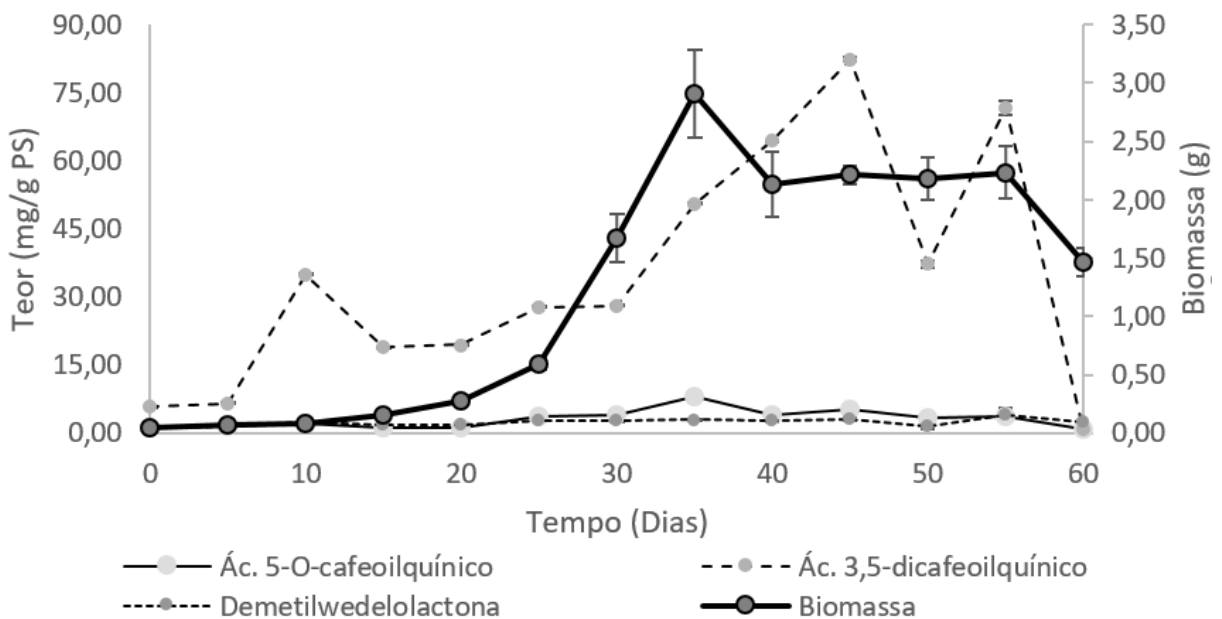
A produção de demetilwedelolactona pelas células de *E. prostrata* no tempo zero do estabelecimento da cultura foi de 1,39 mg g<sup>-1</sup> de PS e o teor foi aumentando com o tempo alcançando o máximo de produção aos 55 dias (4,60 mg g<sup>-1</sup> de PS; 3,3 vezes superior ao teor inicial).

A produção do 5-O-cafeoilquínico começou com 1,46 mg g<sup>-1</sup> de PS e atingiu o maior teor no trigésimo quinto dia (8,15 mg g<sup>-1</sup> de PS; 5,6 vezes superior ao teor inicial), sendo esse tempo o mesmo em que houve maior massa de peso seco das células.

O teor do ácido 3,5-dicafeoil-epi-quínico no primeiro dia de cultura foi de 5,75

mg g<sup>-1</sup> de PS, apresentou aumento no teor aos 10 dias de cultura (35,30 mg g<sup>-1</sup> de PS; 6,1 vezes superior ao teor inicial), com pico máximo aos 45 dias (82,41 mg g<sup>-1</sup> de PS; 14,3 vezes superior ao teor inicial), houve redução no 50º dia (37,23 mg g<sup>-1</sup> de PS), voltou a aumentar no 55º dia (71,77 mg g<sup>-1</sup> de PS), e finalmente reduziu aos 60 dias (0,91 mg g<sup>-1</sup> de PS) de cultivo (Figura 7).

**Figura 7** - Biomassa seca de células em suspensão de *E. prostrata* cultivadas por 60 dias e teor de ácido 5-O-cafeoilquínico, demetilwedelolactona e epímero do ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico.



Recentemente, foi demonstrado que raízes de *E. prostrata* cultivadas *in vitro*, transformadas geneticamente por *Rhizobium rhizogenes*, sob estímulo do ácido jasmônico (JA) produziu expressiva concentração de wedelolactona, demetilwedelolactona e ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico (3,5-diCQA) (MACIEL et al., 2021). A capacidade de produção das células obtidas de raízes quanto ao 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico (82,41 mg g<sup>-1</sup> de PS) foi relevante, quando comparada as raízes transformadas que acumulam substância semelhante a exemplo do 3,5-diCQA (44,71 mg g<sup>-1</sup> de PS).

A produção do ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico como substância majoritária das células em suspensão foi uma descoberta importante, considerando que o 3,5-diCQA apresenta atividade antiviral contra o HIV (ROBINSON et al., 1996) e o SARS-CoV-2 que causa Covid-19. Além disso, apresenta atividade antienvhecimento (LI et al., 2021), antidepressiva (LIM et al., 2020) e anti-inflamatória por inibição do óxido nítrico

(ON) em células RAW 264 induzidas usando lipopolissacarídeo (LPS), reduz a ação da ciclooxigenase-2 (COX2) e do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (HONG et al., 2015; LI et al., 2017; EL-ASKARY et al., 2019). Esta substância também foi encontrada na própolis verde que é produzida por abelhas que visitam principalmente a espécie *Baccharis dracunculifolia* e foi comprovado que o ácido 3,5-dicafeoilquinico tem efeito anti-hipertensivo (MISHIMA et al., 2005; LIM et al., 2020).

Até o momento, foram descritas para o ácido 3,5 dicafeoil-*epi*-quinico, sete atividades, avaliadas em células e animais. Sendo essas: Atividade anti-inflamatória avaliada em cultura de células (NAM et al., 2017); atividade analgésica avaliada em animais (MIJANGOS-RAMOS et al., 2018); atividade inibidora da adipogênese (OH et al., 2018); avaliada em células, ação combatente a dermatite atópica, estudo realizado em animais (RYU et al., 2018); efeito protetor contra UVB, analisado em células (OH et al., 2019; OH et al., 2020); efeito contra a osteoporose, avaliado em células (KARADEMIZ et al., 2020); inibidor enzimático da enzima Aldo Keto reductase (LEE et al., 2009). Por essas evidencias, anteriormente publicadas, apontamos o ácido 3,5 dicafeoil-*epi*-quinico, como molécula promissora para fins farmacológicos.

## 7.9 CULTIVO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO E NO CAMPO

Plantas micropropagadas, aclimatizadas e mantidas na casa de vegetação climatizada até atingirem a comprimento da parte aérea de 45 cm apresentaram elevado teor de wedelolactona (8,82 mg g<sup>-1</sup> de PS) nas partes aéreas e concentração elevada de demetilwedelolactona (19,00 mg g<sup>-1</sup> de PS) nas raízes, quando comparado à plantas com 30 cm (Tabela 6). Estudo realizado por Zafar & Sagar (1999) com *E. prostrata* cultivada *in vitro* relatou que plantas micropropagadas após aclimatização não produziram coumestanos nas raízes e a discrepância entre esse dado e as respostas obtidas no presente trabalho podem estar relacionadas aos genótipos que evidentemente foram diferentes e também ao método de análise, considerando que a análise por espectrofotometria é menos sensível do que a realizada em CLAE.

Os dados apresentados nesse experimento realizado em ambiente climatizado permitem concluir que o cultivo em ambiente climatizado foi favorável à produção de coumestados em *E. prostrata*, e que plantas mais desenvolvidas produzem mais

coumestanos do que plantas jovens, nessas condições.

**Tabela 6** - Efeito de ambiente climatizado no comprimento da parte aérea de planta, peso fresco e seco de parte aérea e raiz, extrato seco e teor de wedelolactona e demetilwedelolactona.

Comprimento da parte aérea da planta (cm)	Peso seco		Extrato seco		Wedelolactona mg g <sup>-1</sup> de PS		Demetilwedelolactona mg g <sup>-1</sup> de PS	
	Parte aérea (g)	Raiz (g)	Parte aérea (g)	Raiz (g)	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz
45	0,855a	0,432a	0,120a	0,054a	8,82 a	0,0 a	2,25 a	19,00 a
30	0,168b	0,052b	0,015b	0,001b	2,57 b	0,0 a	0,22 b	0,40 b
CV(%)	37,49	36,77	21,49	30,97	31,96	0,0	57,44	28,05

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. WD= Wedelolactona; DWD= Demetilwedelolactona

Plantas micropropagadas mantidas no campo de cultivo por 30 dias apresentaram comprimento da parte aérea de  $42 \pm 0,83$  cm, peso seco de parte aérea de  $4,22 \pm 0,62$  g, peso seco de raiz de  $1,09 \pm 0,29$  g extrato seco de parte aérea  $0,48 \pm 0,05$  g e extrato seco de raiz de  $0,11 \pm 0,01$  g. O teor de wedelolactona na parte aérea foi de  $6,55$  mg g<sup>-1</sup> de PS e de demetilwedelolactona foi de  $1,80$  mg g<sup>-1</sup> de PS e as raízes produziram apenas demetilwedelolactona na concentração de  $21,49$  mg g<sup>-1</sup> de PS (Tabela 7).

**Tabela 7** - Teor de wedelolactona e demetilwedelolactona em plantas micropropagadas cultivadas no campo por 30 dias.

Material vegetal	Wedelolactona mg g <sup>-1</sup> de PS	Demetilwedelolactona mg g <sup>-1</sup> de os
Parte aérea	6,55a	1,80b
Raiz	0,00b	21,49a
CV (%)	20,08	42,07

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Com este experimento em campo com planta cultivada por um mês foi possível calcular que um hectare com 160 mil plantas produz 640 kg de massa seca de parte aérea de *E. prostrata*. Também foi calculado a Relação Droga Extrato (RDE) que foi de 8,4:1, ou seja, são necessários 8,4 kg de plantas seca para produzir 1 kg de extrato hidroetanólico (8:2). A RDE é a relação entre a quantidade de droga de origem vegetal empregada na produção de um extrato e a quantidade final de extrato, expresso em peso (p/p) ou volume (p/v), essa medida é preconizada pela Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019), sendo muito importante quando se pretende produzir fitoterápico em escala industrial.

## 7.10 CULTIVO DE CLONE Ep5 DE *Eclipta prostrata* NOS MUNICÍPIOS DO GUARUJÁ E JARDINÓPOLIS

O desenvolvimento em comprimento da parte aérea e massa seca das plantas que cresceram em ambiente litorâneo do Guarujá foram inferiores aquelas crescidas no município de Jardinópolis e o teor de wedelolactona e demetilwedelolactona não diferiram nos diferentes ambientes (Tabela 8).

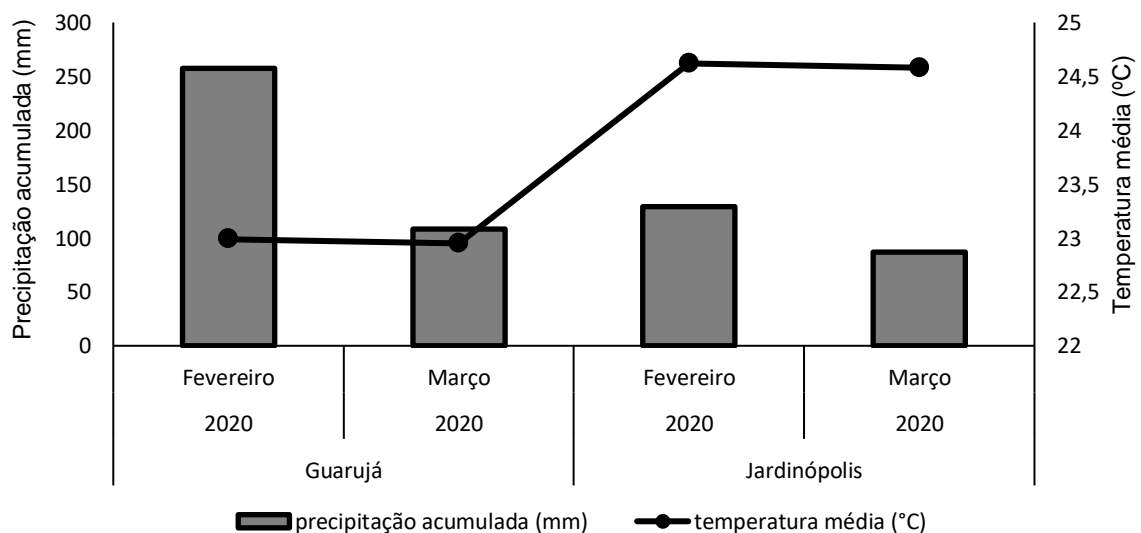
**Tabela 8** - Comprimento da parte aérea da planta, pesos de massa seca e fresca e quantificação de wedelolactona e demetilwedelolactona em plantas de *Eclipta prostrata* cultivadas nos municípios de Guarujá-SP e Jardinópolis-SP.

Localidade	Comprimento da parte aérea (cm)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Wedelolactona (mg g <sup>-1</sup> de PS)	Demetilwedelolactona (mg g <sup>-1</sup> de PS)
G	28,75b	6,26a	0,81b	2,86a	0,80a
J	40,75a	9,78a	2,59a	3,41a	0,91a
CV(%)	17,80	46,26	46,83	57,87	36,72

G=Campus UNAERP Guarujá, J=Jardinópolis. As médias acompanhadas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No mês de março a precipitação acumulada no Guarujá foi maior (100 mm) do que em Jardinópolis (80 mm) e os valores de temperatura foram maior em Jardinópolis (24,5 °C) e menor na região litorânea (23 °C) (Figura 8).

**Figura 8** - Dados de temperatura e precipitação acumulada dos municípios de Guarujá e Jardinópolis.



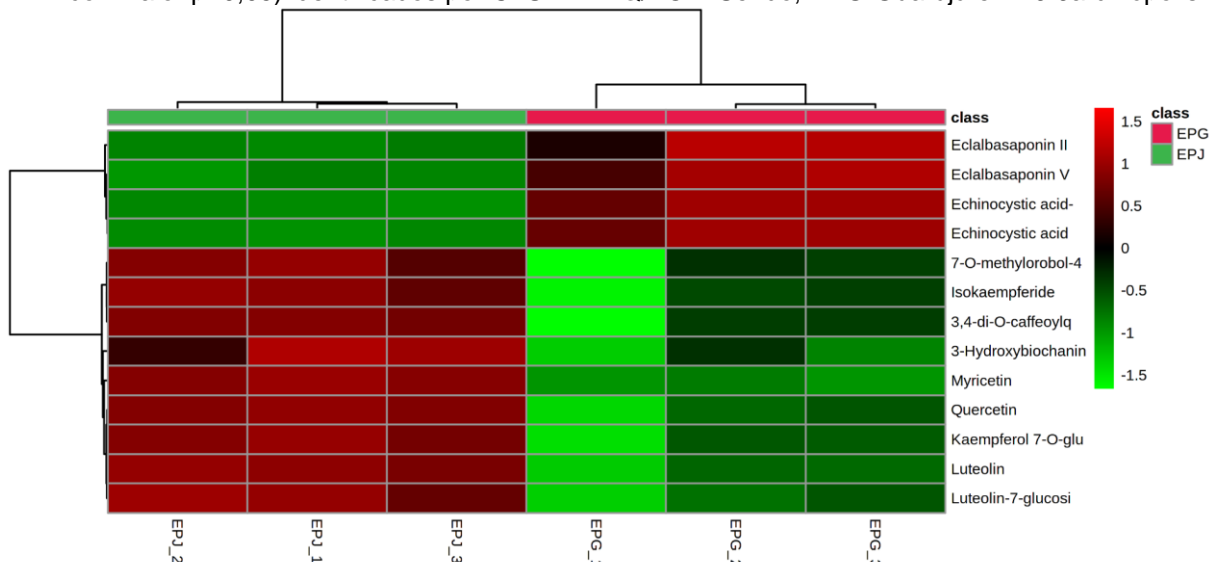
A figura 9 mostra o agrupamento das substâncias e o *heatmap* resultante dos dados estatísticos significativos pelo teste t (APENDICE A). A cor de cada quadrado

da figura 9 representa a intensidade correspondente de cada amostra: o vermelho representa um aumento em termos de intensidade, enquanto o verde representa uma diminuição. Quanto mais escura a cor significa o grau de aumento ou diminuição da intensidade do metabólito. Wedelolactona foi o composto majoritário detectado nas amostras de ambas as áreas, mas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em termos de intensidade pelo teste t (correção FDR;  $p \leq 0,05$ ).

Os flavonoides luteonina, 3-hidroxibiochanina A, quercetina, miricetina, kaempferol, luteolina-7-glucosídeo, 7-O-metil-orobol-4-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, e éster do ácido cafeico 3,4-O-dicafeoilquínico foram produzidos mais intensamente nas plantas que cresceram no município do Jardinópolis e os triterpenos ácido echinocístico, ácido echinocístico 28- $\beta$ -D-glucopiranosídeo e as saponinas eclalbasaponina II e eclalbasaponina V nas plantas que se desenvolveram no Guarujá (Figura 9).

Assim, a maioria dos metabólitos presentes no extrato apresentaram menor intensidade nas plantas localizadas no Guarujá, enquanto as de Jardinópolis apresentaram maior intensidade.

**Figura 9** - Análise de *heatmap* de compostos majoritários de *Eclipta prostrata* (por teste t e correção FDR com valor  $p < 0,05$ ) identificados por CLUE-EM-Q/TOF. Sendo, EPG-Guarujá e EPJ-Jardinópolis.



De modo geral as plantas que crescem em ambientes costeiro apresentam características adaptativas específicas para resistirem aos efeitos do calor, da umidade elevada, salinidade do solo e maresia que é uma névoa formada por gotícula de água salgada, argila diluída e material orgânico microscópico. Nessas condições

pode haver mudanças no teor de metabólitos secundários como um processo de reajuste metabólico em resposta ao ambiente.

O fato de não ter havido alteração no teor de coumestamos em *E. prostrata* que cresceram em ambientes costeiro e não costeiro pode estar relacionado ao fato dessa espécie apresentar grande adaptabilidade a ambos ambientes, considerando que esta espécie é cosmopolita, sendo encontrada desde os trópicos até nas regiões geladas da Sibéria (PERIĆ; RILAK, 2017). Além disso, o fato do teor da wedelolactona não ter sido alterado pelos dois ambientes avaliados foi uma descoberta muito importante, pois demonstra a estabilidade do marcador para o controle de qualidade do fitoterápico.

Estudo realizado com *E. prostrata* sob diferente condição de solos artificialmente salinizados mostrou que a espécie apresentou boa adaptabilidade ao ambiente salino e como algumas plantas se desenvolveram melhor que outras os autores concluíram que houve diferenciação ecofisiológica quanto ao estresse salino, no material vegetal estudado (VARSHNEY; SHARMA, 1979).

Muitos trabalhos têm mostrado alterações significativas no teor de flavonoides que atuam como antioxidantes em plantas expostas a condição de estresse, considerando que essas substâncias controlam de forma ativa as principais etapas do crescimento e diferenciação celular, atuando como reguladores do desenvolvimento da planta inteira e órgãos individuais (AGATI et al., 2012).

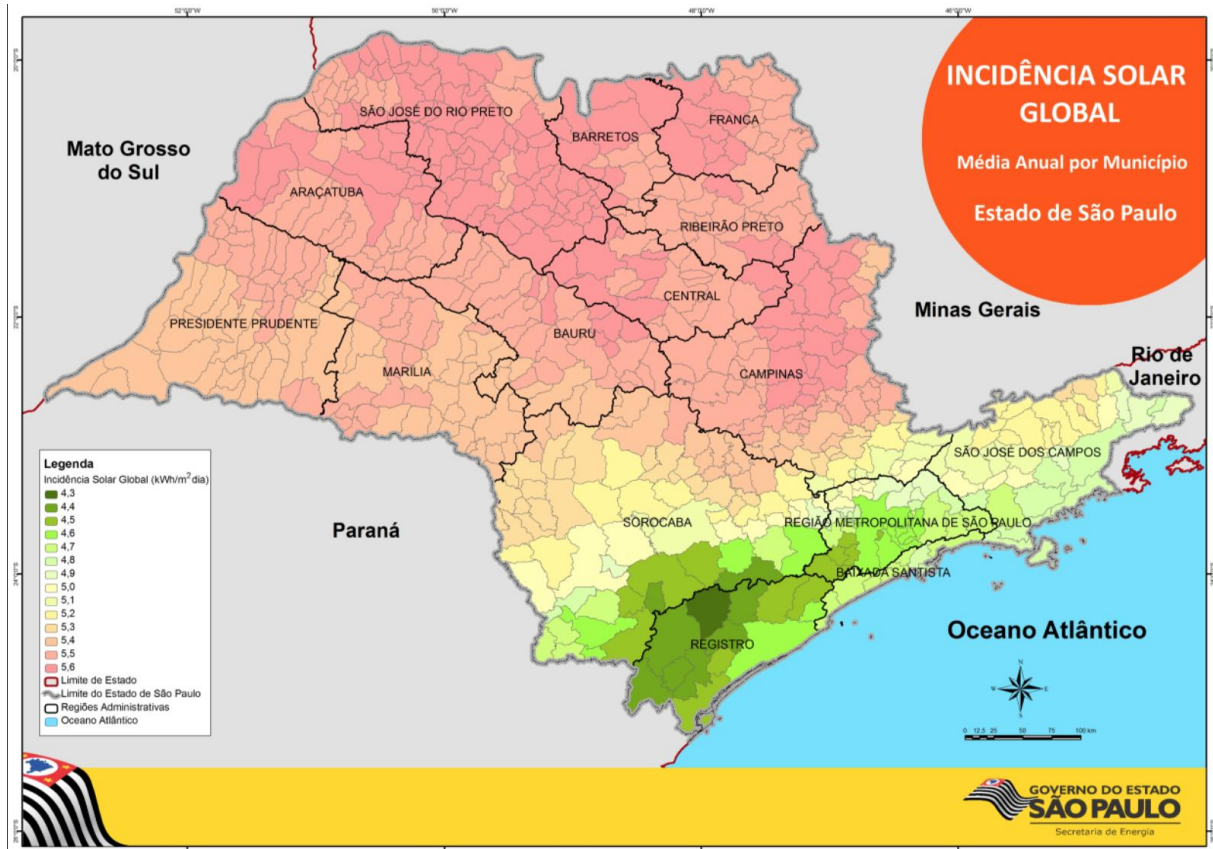
Neste contexto, considerando a incidência solar dos municípios do Guarujá e Jardinópolis, a qual o clone Ep5 de *Eclipta prostrata* foi exposta em 2021, inferimos que, o maior acúmulo dos flavonoides nas plantas cultivadas em Jardinópolis pode estar relacionada a maior incidência solar que essas plantas receberam quando comparada as plantas cultivadas no Guarujá, relacionando o maior acúmulo desses metabólitos como uma forma adaptativa de proteção a luz ultra violeta (Figura 10).

Foi confirmado em estudos realizados com várias espécies de plantas que o aumento da intensidade da radiação solar aumenta a biossíntese de flavonóides pelo aumento da expressão de genes da via geral de fenilpropanóide, que codifica fenilalanina amônia-liase, chalcona sintase, flavanona 3-hidroxilase e dihidroflavonol 4-redutase. Sendo este aumento um mecanismo de proteção que o vegetal apresenta em relação ao estresse causado pela intensa exposição ao sol (TATTINI et al., 2000; JAAKOLA et al., 2004; TATTINI et al., 2005).

Além de flavonoides, os terpenoides também isoprenóides atuam no processo de adaptação de plantas a condições climáticas adversas, atuando como mecanismos

fotoprotetor, podendo aumentar ou diminuir de acordo com os múltiplos fatores aos quais as plantas são submetidas (PEÑUELAS; MUNNÉ-BOSCH, 2005).

**Figura 10** – Incidência solar média nas regiões onde estão situados os municípios de Guarujá e de Jardinópolis, no estado de São Paulo.



Fonte: [https://dadosenergeticos.energia.sp.gov.br/portalecv2/intranet/renovaveis/mapassolar/solar\\_global\\_munic%edpios.jpg](https://dadosenergeticos.energia.sp.gov.br/portalecv2/intranet/renovaveis/mapassolar/solar_global_munic%edpios.jpg)

## 7.11 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS OBTIDOS DA PARTE AÉREA DA PLANTA *Eclipta prostrata*

O isolamento de coumestamos realizado, a partir de 15,00 g de extrato hidroetanólico, gerou frações com massas descritas na tabela 9.

**Tabela 9** - Frações coletadas a partir da eluição de extrato hidroetanólico submetido a fracionamento em coluna de sephadex LH-20

Frações coletadas	Massa
PA.1	0,92 g
PA.2	3,68 g
PA.3	6,63 g
PA.4	1,53 g
PA.5	0,20 g
Volume morto	

O monitoramento dessas frações foi realizado em CLAE, tendo como padrão referência de injeção o coumestano wedelolactona, apontou a fração PA.4, de massa de 1,53 g, como a fração rica nos coumestanos de interesse. Após o fracionamento da fração PA.4 Obteve-se novas frações de massas relatadas na Tabela 10.

**Tabela 10** - Frações coletadas a partir da eluição de fração PA.4 em coluna de sephadex LH-20.

Fração recolhida	Massa
PA.4.0	0,51 g
PA.4.1	0,24 g
PA.4.2	0,48 g
PA.4.3	0,12 g
Volume morto	

A fração PA4.3, rica em coumestanos, foi purificada em CLAE preparativo e as substâncias isoladas identificadas por métodos espectroscópicos.

## 7.12 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DAS ESTRUTURAS ISOLADAS DA CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *Eclipta prostrata*

A identificação do ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) foi realizada pela análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC e COSY (ANEXOS 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente); bem como a partir da comparação desses dados com a literatura. (LIU et al., 2020).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra (ANEXO 1) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta\text{H}$  7,05 (sl, H2'),  $\delta\text{H}$  6,78 (d, H5') e  $\delta\text{H}$  6,95 (dl, H6'). Também foram observados os sinais em  $\delta\text{H}$  7,56 (d, 16.0, H7') e  $\delta\text{H}$  6,27 (d, 16.0, H8'), característicos de um sistema olefínico conjugado de configuração trans.

No mapa de contorno HMBC (ANEXO 4) foi possível observar a correlação do hidrogênio H8' ( $\delta\text{H}$  6.37) com o carbono C1' ( $\delta\text{C}$  127,7) e C9' ( $\delta\text{C}$  168,8), além da correlação entre o H7' ( $\delta\text{H}$  7,56) e os carbonos C2' ( $\delta\text{C}$  115,2), C6' ( $\delta\text{C}$  123,0) e C9' ( $\delta\text{C}$

168,8). Estas correlações confirmam a ligação do anel aromático ao sistema olefínico conjugado.

A numeração das posições da unidade de ácido quínico nos derivados de ácidos clorogênicos foi estabelecida de acordo com a recomendação da IUPAC, em que o carbono C1 do ácido quínico é aquele que apresenta um grupamento hidroxila na posição axial e um grupamento carboxila em equatorial, enquanto que o carbono C3 é aquele que possui hidroxila na posição axial (IUPAC, 1976) (Tabela 11).

De acordo com Wei et al. (2010), a diferenciação entre os isômeros dos ácidos cafeoilquínicos pode ser feita com base nos valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) dos carbonos C3, C4 e C5 do ácido quínico, em que os valores de  $\delta$  para o isômero 3-CQA são  $\delta C$  73,8 (C3);  $\delta C$  74,6 (C4);  $\delta C$  67,9 (C5); enquanto que para o isômero 4-CQA os valores são  $\delta C$  69,1 (C3);  $\delta C$  78,7 (C4) e  $\delta C$  65,9 (C5). No caso do isômero 5-CQA, todos os valores de deslocamento químico para estas posições são acima de 70 ppm, valores estes observados no espectro de RMN  $^{13}C$  da amostra.

O espectro de RMN de  $^1H$  ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico da amostra (ANEXO 6) apresentou dubletos em  $\delta H$  6,45 (d, 16,0, H8'),  $\delta H$  6,56 (d, 16,0, H8''),  $\delta H$  7,73 (d, 15,5, H7') e  $\delta H$  7,75 (d, 15,5, H7''), característicos de hidrogênios olefínicos, com configuração *trans*. Também foram observados sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta H$  7,21 (s, H2'),  $\delta H$  7,10 (d, 7,5, H5'),  $\delta H$  6,93 (d, 8,0, H6'),  $\delta H$  7,23 (s, H2''),  $\delta H$  7,10 (d, 7,5, H5''), 6.92 (d, 8,0, H6''), indicando a presença de duas unidades cafeoíla.

Os sinais em  $\delta H$  2.10-2.43 (m, H2),  $\delta H$  5.66 (m, H3),  $\delta H$  4.07 (dl, H4),  $\delta H$  5.53 (m, H5) e  $\delta H$  2.10-2.43 (m, H6) foram atribuídos aos hidrogênios a molécula do ácido quínico (Tabela 12).

O experimento HMBC (ANEXO 9) permitiu observar as correlações do hidrogênio em  $\delta H$  5,53 (H-5) com o carbono em  $\delta C$  169,6 (C-9''); e do hidrogênio em  $\delta H$  5,66 (H-3) com o carbono em  $\delta C$  169,1 (C-9'), indicando a ligação dos grupos cafeoíla à molécula de ácido quínico.

**Tabela 11** - Dados espectroscópicos do ácido 5-O-cafeoilquínico.

Posição	$\delta_c^*$	$\delta_H^*$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	74.8	-	76.3	-
2	36.8	1.96–2.17 (2H, m)	38.9	2.05-2.31 (2H, m)
3	70.0	4.08 (1H, ddd, 1.8, 4.9, 4.9)	71.4	4.17 (1H, m)
4	72.1	3.65 (1H, dd, 3.1, 8.8)	73.6	3.73 (1H, dl, 8.0)
5	70.5	5.25 (1H, ddd, 4.5, 9.4, 9.4)	72.1	5.33 (1H, m)
6	37.4	1.96–2.17 (2H, m)	38.3	2.05-2.31 (2H, m)
7	175.6	-	177.4	-
1'	126.4	-	127.8	-
2'	113.8	6.96 (1H, d, 2.1)	115.2	7.05 (1H, sl)
3'	145.3	-	146.8	-
4'	148.1	-	149.6	-
5'	115.1	6.68 (1H, d, 8.2)	116.5	6.78 (1H, 8.0)
6'	121.6	6.86 (1H, dd, 2.1, 8.2)	123.0	6.95 (1H, 8.0)
7'	145.7	7.48 (1H, d, 15.9)	147.1	7.56 (1H, 16.0)
8'	113.8	6.19 (1H, d, 15.9)	115.3	6.37 ((1H, 16.0)
9'	167.3	-	168.8	-

(CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H= 400MHz; <sup>13</sup>C = 100MHz); d= dubleto; dd= duplo dubleto; ddd = duplo duplo dubleto; m=multipléto; sl= singleto largo; \* = Dados da literatura (LIU et al., 2020).

**Tabela 12** - Dados espectroscópicos do ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico.

Posição	$\delta_c^{**}$	$\delta_H^{**}$	$\delta_c$	$\delta_H$
1	76.3	-	76.3	-
2	40.6	2.11 m	40.7	2.10-2.43 m
3	72.4	5.55 dt (10.0, 5.8)	73.0	5.66 m
4	73.0	3.91 dd (9.9, 3.4)	72.5	4.07 dl
5	74.4	5.39 m	74.4	5.53 m
6	37.5	2.28 dd (15.2, 3.4); 2.04 m	37.6	2.10-2.43 m
7	181.3	-	181.4	-
1'	127.8	-	127.9	-
2'	115.2	7.06 d (2.0)	116.5	7.21 s
3'	146.8	-	146.7	-
4'	149.2	-	149.4	-
5'	116.4	6.78 d (8.2)	116.5	7.10 d (7.5)
6'	122.9	6.96 dd (8.2, 2.0)	123.1	6.93 d (8.0)
7'	146.6	7.59 d (15.8)	146.9	7.73 d (15.5)
8'	115.4	6.3 d (15.8)	115.5	6.45 d (16.0)
9'	169.0	-	169.1	-
1''	128.0	-	128.1	-
2''	115.2	7.08 d (2.0)	115.2	7.23 s
3''	146.9	-	146.8	-
4''	149.4	-	149.5	-
5''	116.4	6.78 d (8.2)	116.5	7.10 d (7.5)
6''	122.9	6.97 dd (8.2, 2.0)	123.1	6.92 d (8.0)
7''	146.6	7.62 d (15.8)	147.0	7.75 d (15.5)
8''	115.9	6.43 d (15.8)	116.0	6.56 d (16.0)
9''	169.4	-	169.6	-

(CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H= 400MHz; <sup>13</sup>C = 100MHz); d= dubleto; dd= duplo dubleto; ddd = duplo duplo dubleto; m=multipléto; sl= singleto largo; \*\* = Dados da literatura (KIM; LEE, 2005).

A identificação do ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico foi realizada pela análise dos dados de RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC e COSY (ANEXOS 6, 7, 8, 9 e 10,

respectivamente), bem como a partir da comparação desses dados com a literatura (KIM; LEE, 2005).

## 8 CONCLUSÃO

As plantas *in vitro* cultivadas em meio de cultura MS e WP apresentaram diferenças quanto ao teor de coumestanos, sendo o meio WP mais efetivo para a produção de demetilwedelolactona. Células em suspensão produzidas a partir de raízes de *E. prostrata* produziram majoritariamente o ácido 3,5-dicafeioil-*epi*-quínico, sendo essa descoberta realizada pela primeira vez na espécie. Os genótipos de *Eclipta* mantidos na coleção do Horto de Plantas Medicinais da Farmácia da Natureza apresentaram variação quanto ao teor de coumestanos, com diferentes proporção entre eles e todos os genótipos apresentaram wedelolactona. Plantas micropropagadas cultivadas em estufa ou no campo, por 30 dias, produziram elevado teor de coumestanos e as plantas cultivadas em Jardinópolis e no Guarujá apresentaram teores semelhantes de wedelolactona. Entretanto, as que cresceram na região costeira acumularam mais triterpenos e saponinas e se desenvolveram menos que aquelas localizadas em Jardinópolis, as quais produziram mais flavonoides.

## 9 APENDICES

### APENDICE A

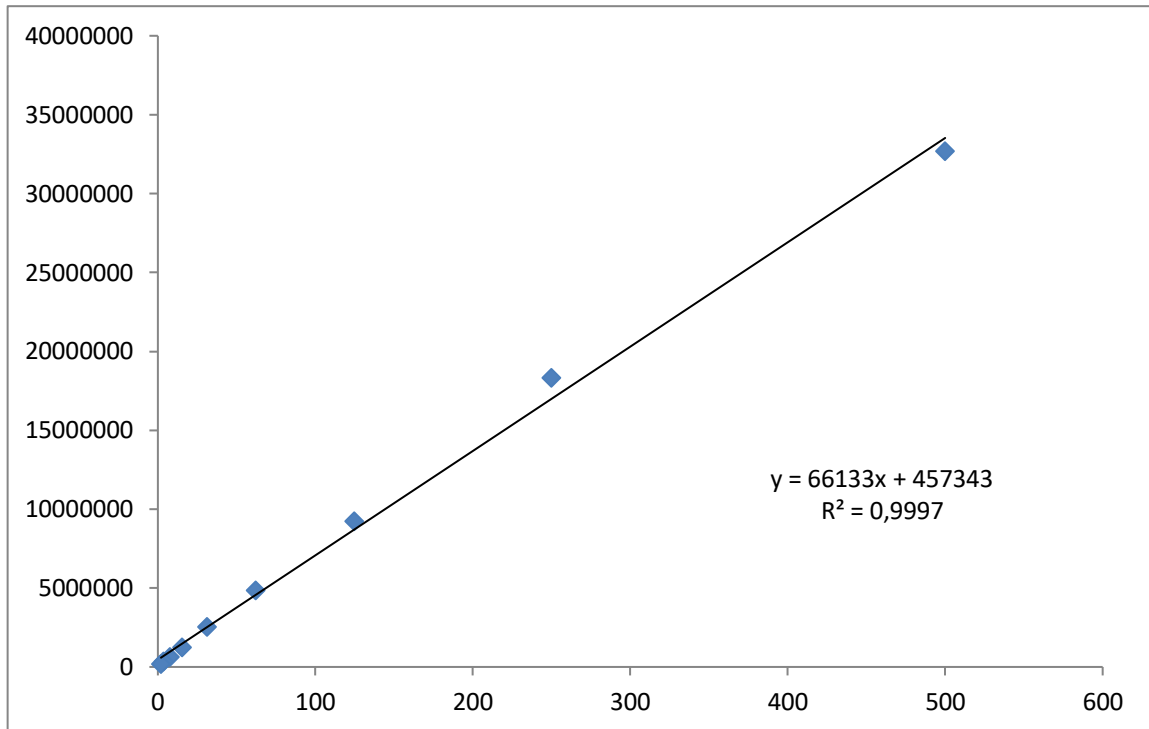
**Tabela 13-** Substâncias estatisticamente significativas (Teste t e correlação FDR com valor de  $p < 0.05$ ) identificado por CLUE-EM-Q/TOF.

Substâncias	EPG vs EPJ	
	p-value	FDR
3-hidroxiobiochanina A	1E <sup>-02</sup>	2E <sup>-02</sup>
7-O-metil-orobol-4-O-β-D-glucopiranosideo	2E <sup>-02</sup>	2E <sup>-02</sup>
Ácido 3,4-O-dicafeoilquínico	2E <sup>-02</sup>	2E <sup>-02</sup>
Ácido Echinocístico	1E <sup>-04</sup>	6E <sup>-04</sup>
Ácido echinocístico 28-β-D-glucopiranosideo	1E <sup>-04</sup>	6E <sup>-04</sup>
Eclalbasaponina II	7E <sup>-03</sup>	1E <sup>-02</sup>
Eclalbasaponina V	1E <sup>-03</sup>	3E <sup>-03</sup>
Isokaempferido	1E <sup>-02</sup>	2E <sup>-02</sup>
Kaempferol 7-O-glucosideo	4E <sup>-03</sup>	7E <sup>-03</sup>
Luteolina-7-glucosideo	3E <sup>-03</sup>	5E <sup>-03</sup>
Luteonina	1E <sup>-03</sup>	3E <sup>-03</sup>
Miricetina	1E <sup>-05</sup>	2E <sup>-04</sup>
Quercetina	3E <sup>-03</sup>	5E <sup>-03</sup>

EPG: *Eclipta prostrata* Guarujá; EPJ: *Eclipta prostrata* Jardinópolis; Valores de acordo com teste Student's e correlação post hoc Benjamini Hochberg (FDR).

**APENDICE B**

## Wedelolactona

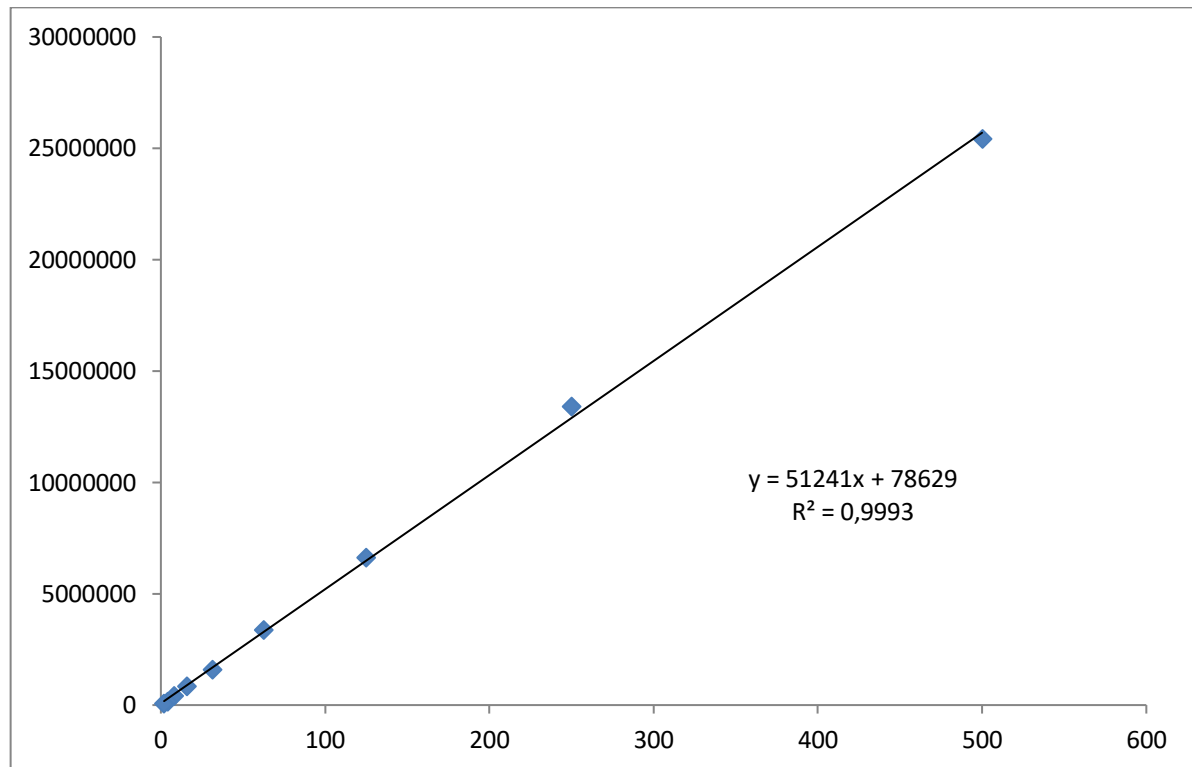


Limite de Detecção (LOD) = 0,30

Limite de Quantificação (LOQ) = 0,90

## APENDICE C

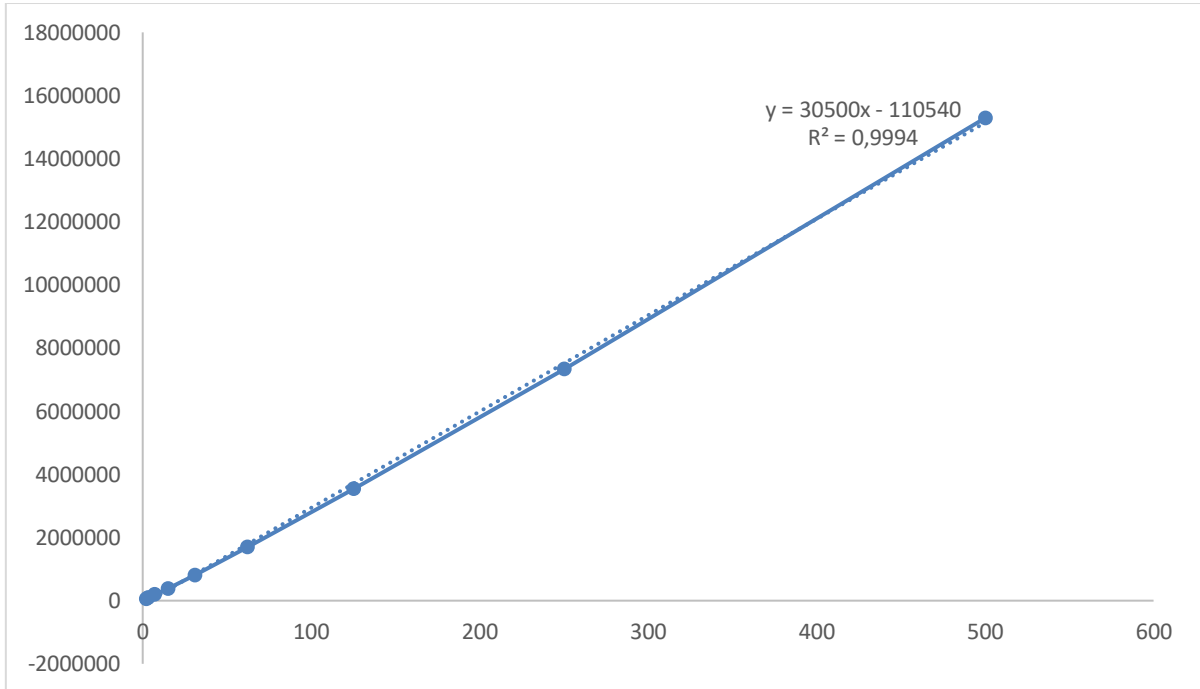
## Demetilwedelolactona



Limite de Detecção (LOD) = 1,57

Limite de Quantificação (LOQ) = 4,77

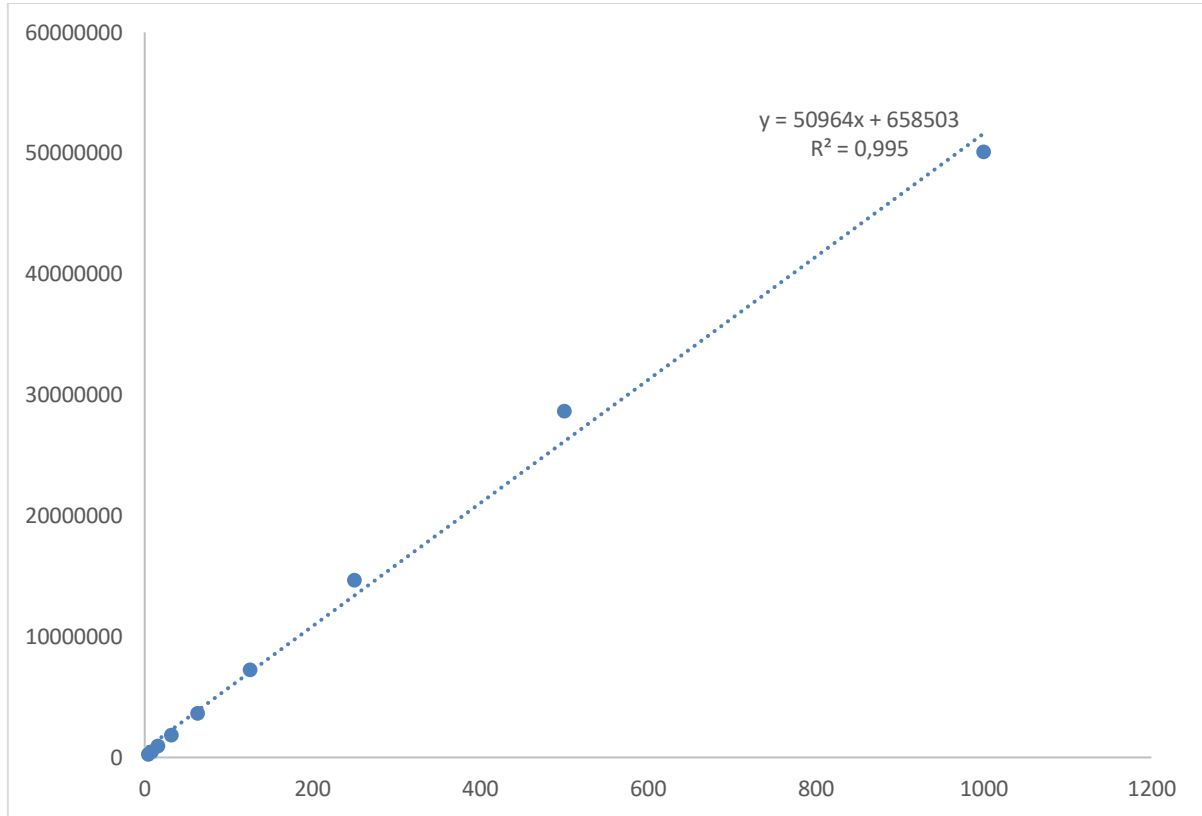
**APENDICE D**  
**Ácido 5-O-cafeoilquinico**



Limite de Detecção (LOD) = 2,25

Limite de Quantificação (LOQ) = 6,82

**APENDICE E**  
**Ácido 3,5 dicafeoil-*epi*-quinico**



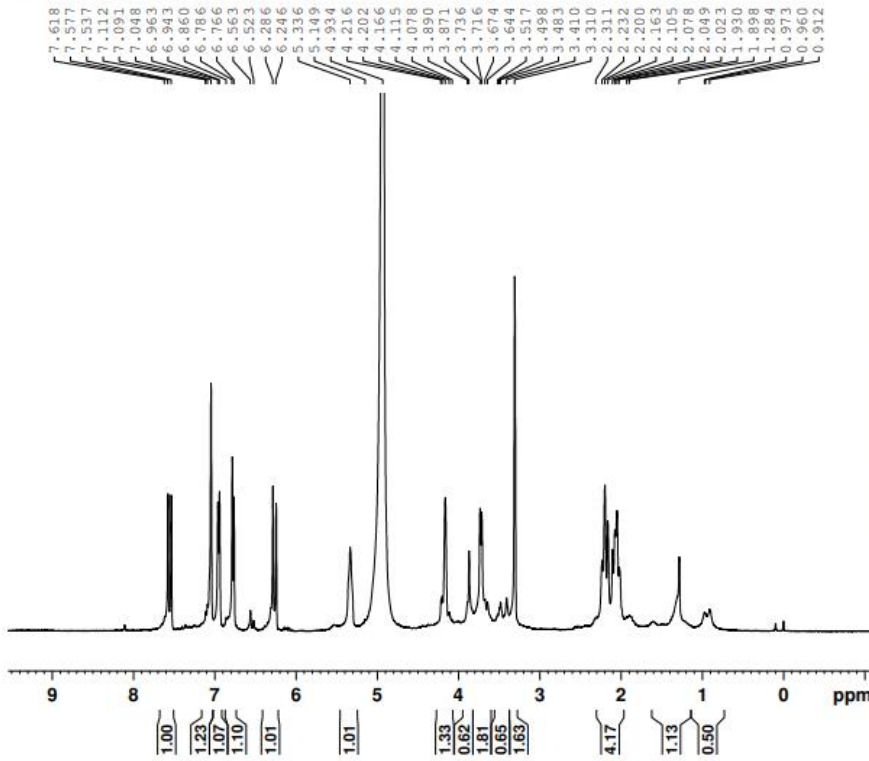
Limite de Detecção (LOD) = 1,11

Limite de Quantificação (LOQ) = 3,36

10 ANEXOS

ANEXO 1 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do ácido 5-O-cafeoilquínico.

PROTON128 MeOD {C:\Bruker\TOPSPIN} ana\_unaerp 28

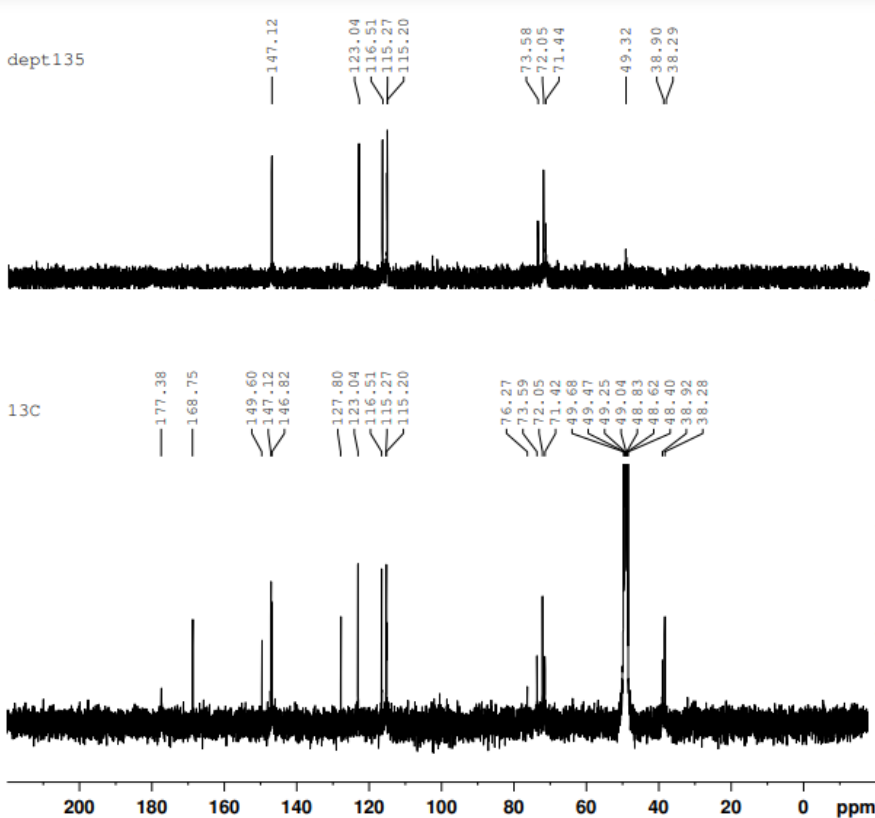


```

NAME          epcalos
EXPNO         2
PROCNO        1
Date_         20210826
Time          9.02
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm Dual 13C/
PULPROG       zg30
TD            65536
SOLVENT       MeOD
NS            128
DS            0
SWH           8278.146 Hz
FIDRES        0.126314 Hz
AQ            3.9584243 sec
RG            4096
DW            60.400 usec
DE            6.50 usec
TE            300.0 K
D1            2.00000000 sec
TD0           1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P1            12.00 usec
PL1           1.10 dB
SFO1          400.1324710 MHz
SI            32768
SF            400.1300099 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            1.00
    
```

ANEXO 2 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C do ácido 5-O-cafeoilquínico



```

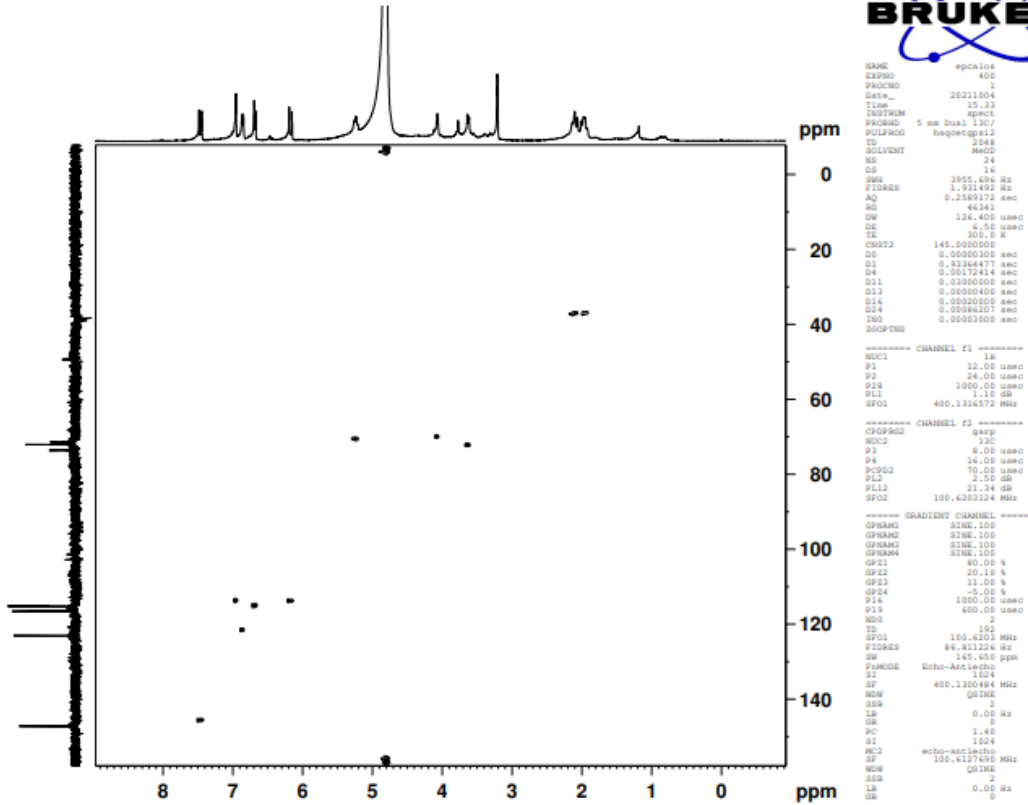
NAME          epcalos
EXPNO         15
PROCNO        1
Date_         20211004
Time          13.29
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm Dual 13C/
PULPROG       zgpg30
TD            65536
SOLVENT       MeOD
NS            3072
DS            4
SWH           23980.814 Hz
FIDRES        0.365918 Hz
AQ            1.3664756 sec
RG            3649.1
DW            20.850 usec
DE            6.50 usec
TE            300.0 K
D1            2.00000000 sec
D11           0.03000000 sec
TD0           1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          13C
P1            8.00 usec
PL1           2.50 dB
SFO1          100.6228298 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2       waltz16
NUC2          1H
PCPD2         100.00 usec
PL2           1.10 dB
PL12          20.19 dB
PL13          22.50 dB
SFO2          400.1316005 MHz
SI            32768
SF            100.6126261 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            1.00 Hz
GB            0
PC            1.40
    
```

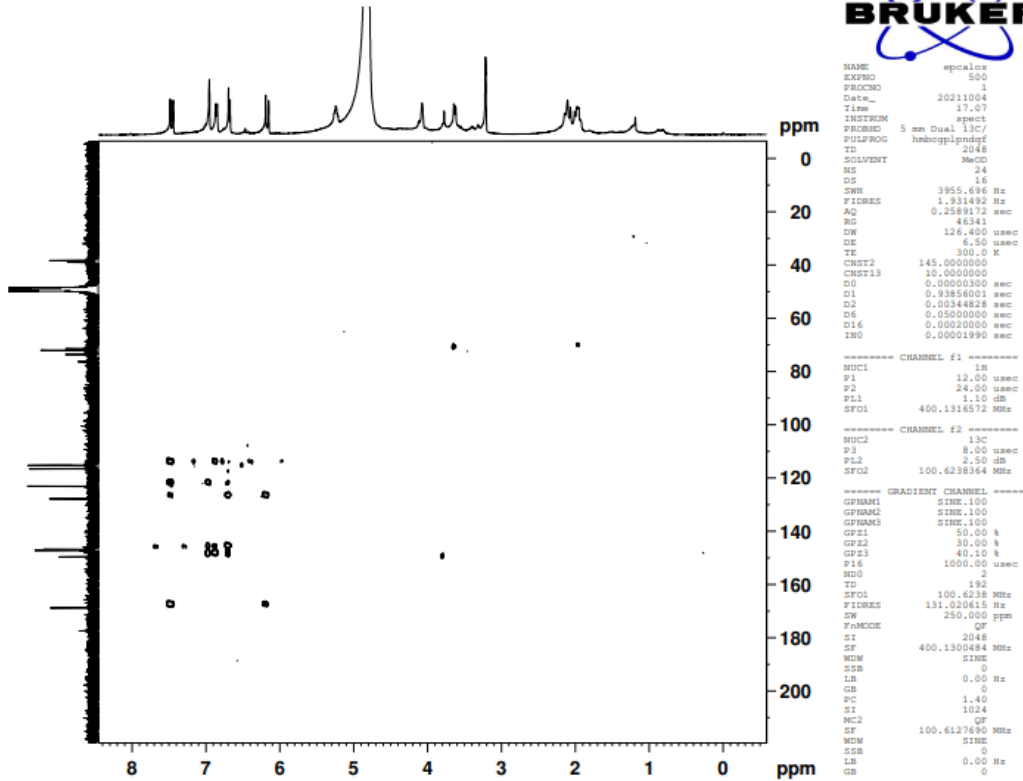
**ANEXO 3 - Mapa de contorno HSQC do ácido 5-O-cafeoilquínico**

HSQCGP MeOD {C:\Bruker\TOPSPIN} ana\_unaerp 2



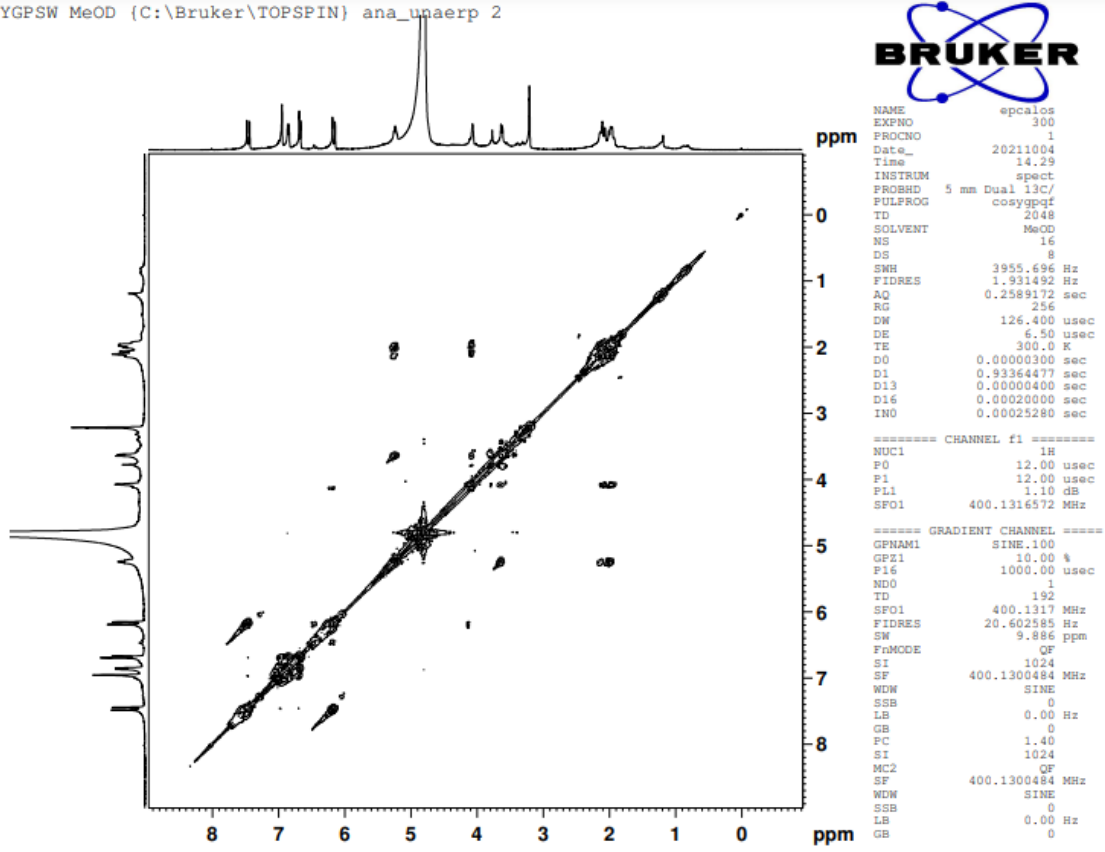
**ANEXO 4 - Mapa de contorno HMBC do ácido 5-O-cafeoilquínico**

HMBCGP MeOD {C:\Bruker\TOPSPIN} ana\_unaerp 2

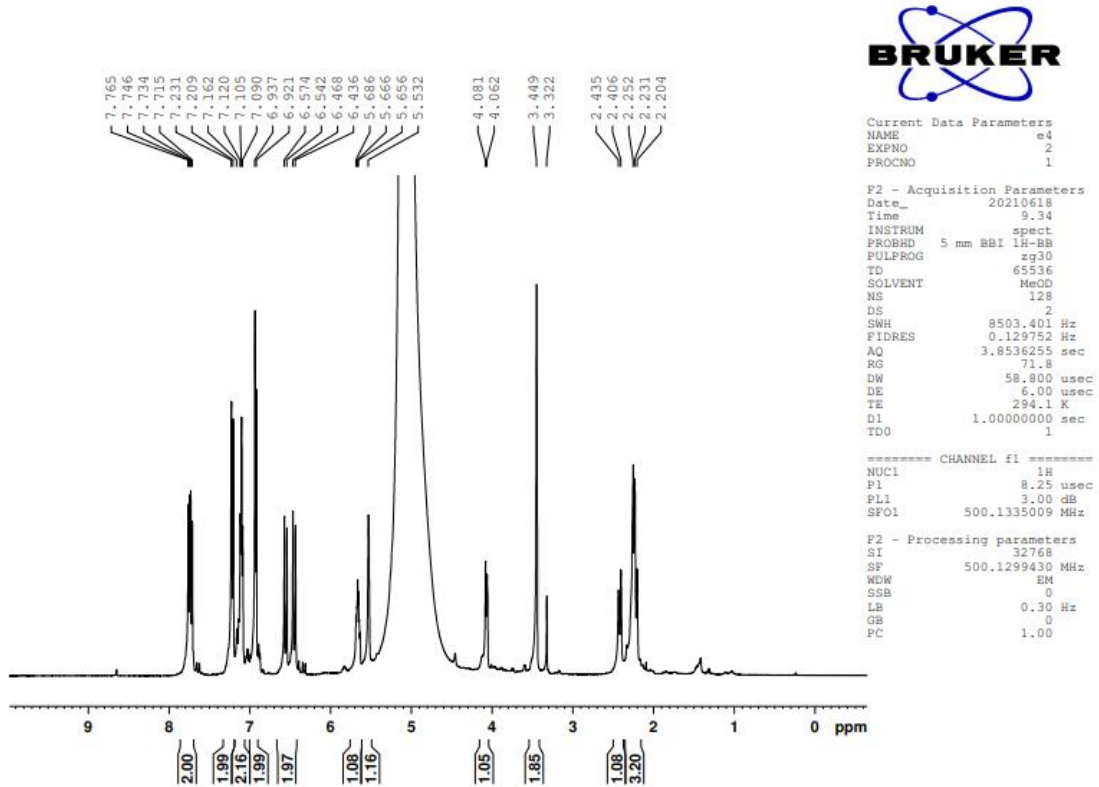


**ANEXO 5 - Mapa de correlação COSY do ácido 5-O-cafeoilquínico.**

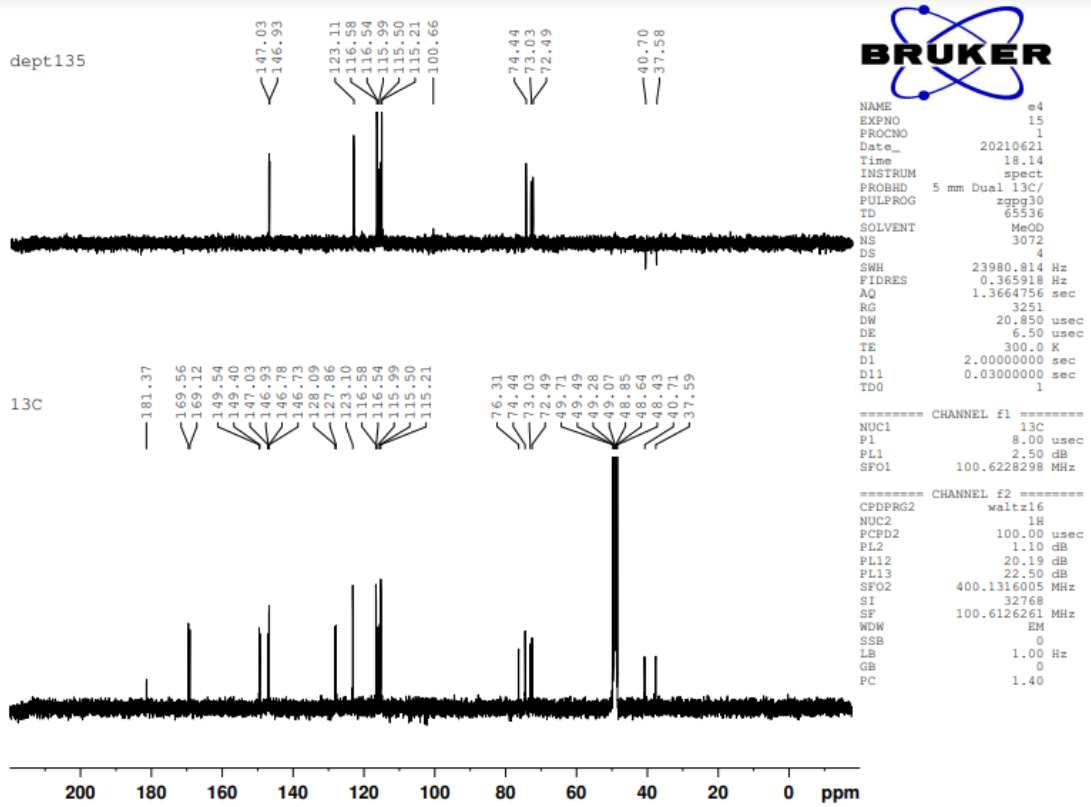
COSYGPSW MeOD (C:\Bruker\TOPSPIN) ana\_unaerp 2



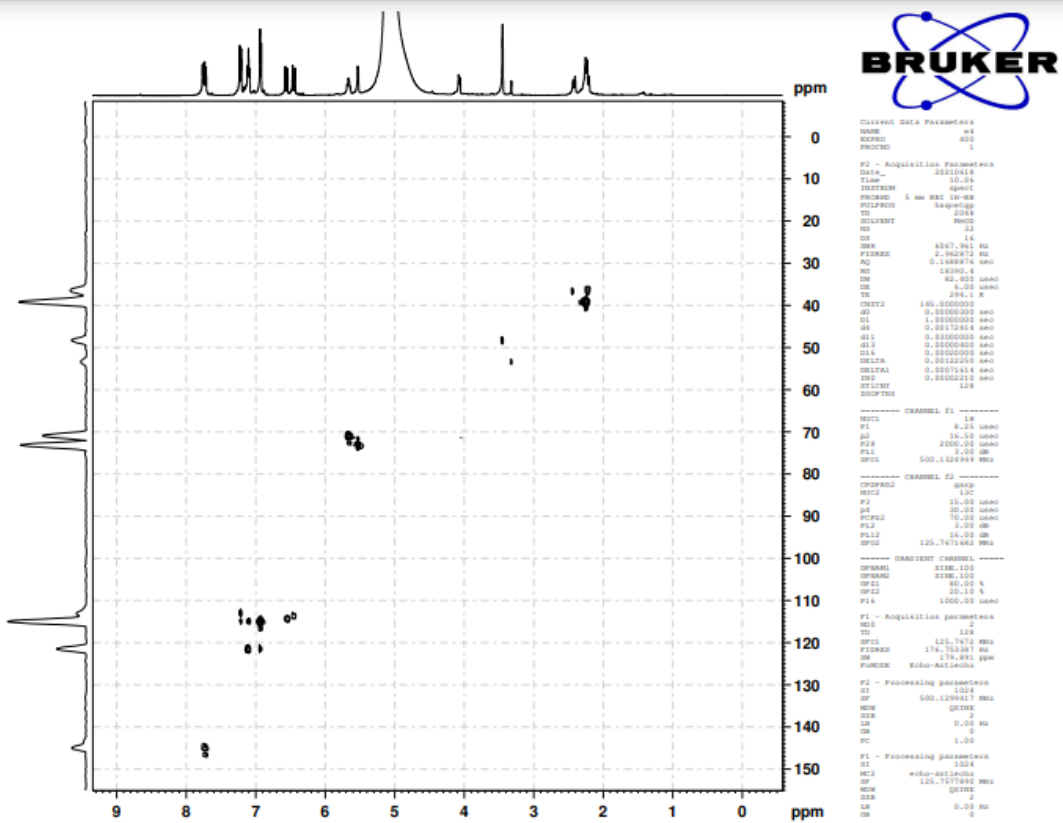
**ANEXO 6 - Espectro de RMN<sup>1</sup>H do ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico**



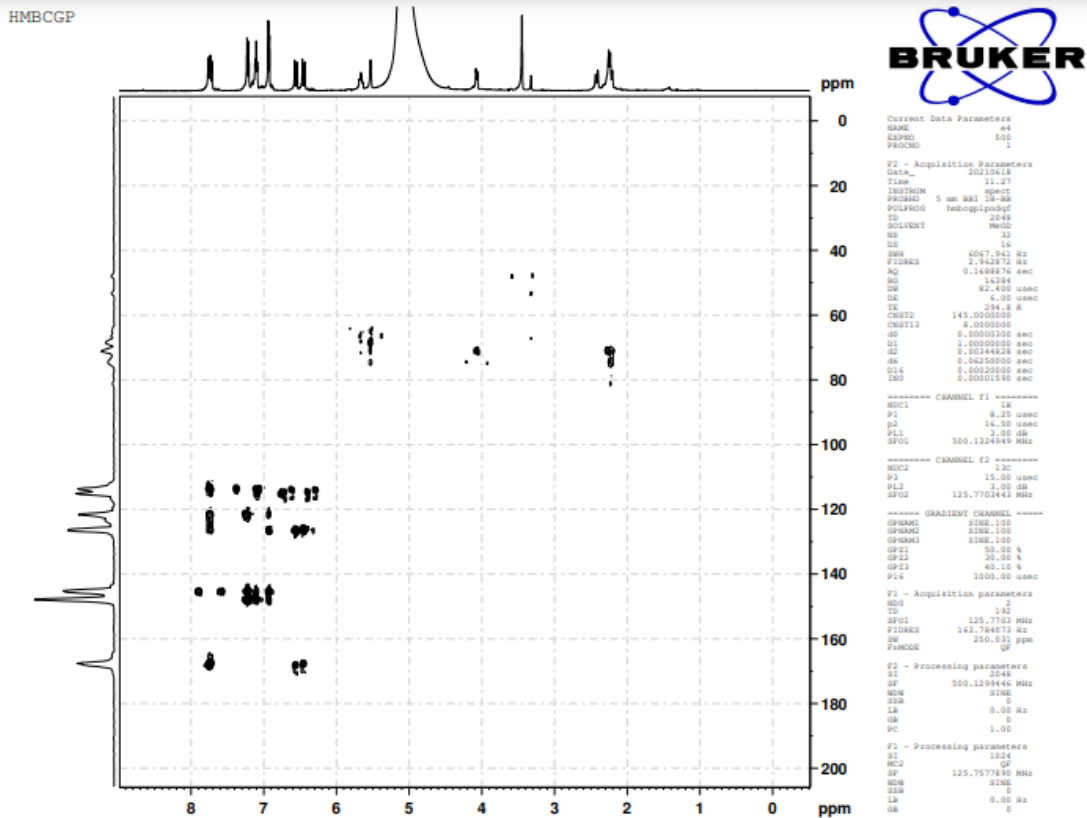
ANEXO 7 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C do ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico



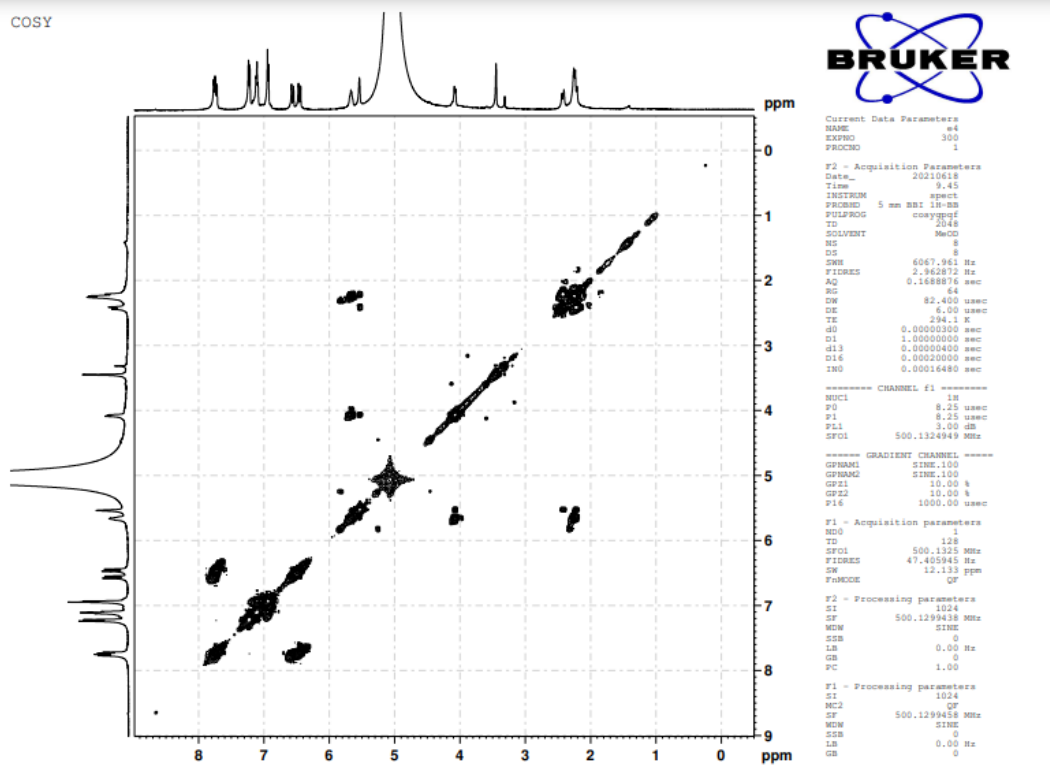
ANEXO 8 - Mapa de contorno HSQC do ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico



ANEXO 9 - Mapa de contorno HMBC do ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico



ANEXO 10 - Mapa de correlação COSY do ácido 3,5-dicafeoil-*epi*-quínico



## ANEXO 11 - Análise de solo Campus Guarujá

## RESULTADO DA ANÁLISE DE SOLO - MACRONUTRIENTE

M.O Materia Orgânica	pH Solução CaCl <sub>2</sub>	P Fosforo Resina	K Potássio	Ca Cálcio	Mg magnésio	Al Alumínio	S-SO <sub>4</sub> Enxofre	S.B Soma de Bases	H+Al Acidez Potencial	C.T.C Cap. Troca Catiônica	V Saturação de Bases
g/dm <sup>3</sup> 80	7,2	mg/dm <sup>3</sup> 37	-----mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----				mg/dm <sup>3</sup> 33	-----mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----			95
			2,7	155	13	-----		170,7	9	179,7	

## RESULTADO DA ANÁLISE DO SOLO - MICRONUTRIENTE

B Boro	Cu Cobre	Fe Ferro	Mn Manganês	Zn Zinco
-----mg/dm <sup>3</sup> -----				
0,50	2,1	52	16,3	7,6

## ANEXO 12 - Análise de solo Jardinópolis

## RESULTADO DA ANÁLISE DE SOLO - MACRONUTRIENTE

M.O Materia Orgânica	pH Solução CaCl <sub>2</sub>	P Fosforo Resina	K Potássio	Ca Cálcio	Mg magnésio	Al Alumínio	S-SO <sub>4</sub> Enxofre	S.B Soma de Bases	H+Al Acidez Potencial	C.T.C Cap. Troca Catiônica	V Saturação de Bases
g/dm <sup>3</sup> 30	6,1	mg/dm <sup>3</sup> 19	-----mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----				mg/dm <sup>3</sup> 4	-----mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----			74
			2,5	40	19	-----		61,5	22	83,5	

## RESULTADO DA ANÁLISE DO SOLO - MICRONUTRIENTE

B Boro	Cu Cobre	Fe Ferro	Mn Manganês	Zn Zinco
-----mg/dm <sup>3</sup> -----				
0,33	8,1	19	38,8	1,7

## REFERÊNCIAS

- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Sci.** 196:67-76, 2012. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014.
- BASKARAN, P.; JAYABALAN, N. An efficient micropropagation system for *Eclipta alba*, A valuable medicinal herb, **In vitro Cell Dev Biol - Plant**, 41:532-539, 2005.
- BINDU, K. H.; ROHINI, MR. Bhringaraj-prized medicinal herb. ICAR-Indian Institute of Horticultural Research. Extension folder no-115. **Publication committee**, IHR-2020.
- BORTHAKUR, M.; DUTTA, K.; NATH, S.C.; SINGH, R.S. Micropropagation of *Eclipta alba* and *Eupatorium adenophorum* using a single-step nodal cutting technique **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 62: 239–242, 2000.
- BRASIL, 2019. Farmacopeia Brasileira 6ª edição. Volume 1 p.47, 2019.
- CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Science**, 74(17):2157-2184, 2004.
- CHEN, H.; LIN, Y.; WU, J.; CHEN, Y.; YANG, S.; CHEN, J.; CHEN, T. Prescription patterns of Chinese herbal products for menopausal syndrome: Analysis of a nationwide prescription database. **Journal of Ethnopharmacology** 137:1261–1266, 2011.
- DAR, R.A.; KOSHY, E.; THOMAS, G Indirect Organogenesis in *Eclipta prostrata* (L.) L. **Vegetos** 29:14-19, 2016.
- DEVENDRA, B. N., N.; SRINIVAS AND A. SANDEEP REDDY. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in nodal explant cultures of *Eclipta alba* L. Hassk. **Annals of Biological Research**, 2(3): 143-149, 2011.
- DHAKA, N. A Review on Tissue Culture Studies in *Eclipta alba* – An Important Medicinal Plant, **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, 22(2):48, 269-275, 2013.
- DHAKA, N.; KOTHARI, S.L. Micropropagation of *Eclipta alba*, (L.) Hassk - an important medicinal plant, **In Vitro Cell Dev Biol**, 41: 658-661, 2005.
- DUC, N.H. VO, A.T.; HADDIDI, I.; DAOOD, H.; POSTA, K. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Improve Tolerance of the Medicinal Plant *Eclipta prostrata* (L.) and Induce Major Changes in Polyphenol Profiles Under Salt Stresses. **Frontiers in Plant Science**, 11: 612299, 2021.
- EL-ASKARY, H., HANDOUSSA, H., BADRIA, F., EL-KHATIB, A.H., ALSAYARI, A., LINSCHIED, M.W., ABDEL, A. Characterization of hepatoprotective metabolites from

*Artemisia annua* and *Cleome droserifolia* using HPLC / PDA / ESI / MS – MS. **Rev. Bras. Farmacogn.** 29: 213–220, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.10.001>

FERREIRA, D. F. Sisvar 5.1 - Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows. Lavras: **Universidade Federal de Lavras**, 2005.

FRANÇA, S.C.; BERTONI, B.W.; PEREIRA, A.M.S. Antihepatotoxic agent in micropropagated plantlets of *Eclipta alba*. **Plant Cell, tissue and Organ Culture** 40: 297-299, 1995.

GAWDE, A.J.; PARATKAR, G.T. Production and enhancement of wedelolactone in shoot cultures of *Eclipta alba*, **Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants**, 18: 203-209, 2012.

GHULE, S.C.; CHAUDHARI, S.R.; CHAVAN, M.J. Anthelmintic potencital of *Eclipta alba* (L.) Hassk against *Pheretima posthuma*. **International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, 3(1):143-144, 2011.

GOLMOHAMMADI, M. J.; CHAMANABAD, H.R.M.; YAGHOUBI, B.; OVEISI, M. Study of Postharvest Weed Population in Paddy Fields **Sarhad Journal of Agriculture**, 34(2): 395-399, 2018. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.sja/2018/34.2.395.399>

GUENNÉ, S.; OUATTARA, N.; OUÉDRAOGO, N.; CIOBICA, A.; HILOU, A.; KIENDREBÉOGO, M. Phytochemistry and neuroprotective effects of *Eclipta alba* (L.) Hassk. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**. 20190026, 2019.

HONG, S.; JOO, T.; JHOO, J. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of 3,5-Dicaffeoylquinic Acid Isolated from *Ligularia fischeri* Leaves **Food Science and Biotechnology** 24:257–263, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0034-y>

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC); IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN); **Biochem. J.** 153: 23, 1976.

JAAKOLA, L.; MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K.; KÄRENLAMPI, S.; HOHTOLA, A. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L) leaves. **Planta** 218(5):721-8, 2004.

JAHAN, R.; AL-NAHAIN, A.; MAJUMDER, S.; RAHMATULLAH, M. Ethnopharmacological Significance of *Eclipta alba* (L.) Hassk. (Asteraceae). **International Scholarly Research Notices** 1-22, 2014.

JORDAN, D. L.; LANCASTER, S.H.; LANIER, J.E.; LASSITER, B.R.; JOHNSON, P.D. Peanut and Eclipta (*Eclipta prostrata*) Response to Flumioxazin. **Weed Technology** 23:231-235, 2009.

JOSHI, T.; JOSHI, T.; SHARMA, P.; MATHPAL, S.; PUNDIR, H.; BHATT, V.; CHANDRA, S. *In silico* screening of natural compounds against COVID- 19 by targeting Mpro and ACE2 using molecular docking. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 24:4529–4536, 2020.

KARADENIZ, F.; OH, J.H.; LEE, J.I.; SEO, Y.; KONG, C. 3,5-dicaffeoyl-epi-quinic acid from *Atriplex gmelinii* enhances the osteoblast differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells via Wnt/BMP signaling and suppresses adipocyte differentiation via AMPK activation. **Phytomedicine** 71, June 2020, 153225

KHURSHID, R.; KHAN, T.; ZAEEM, A.; GARROS, L.; HANO, C.; ABBASI, B.H. Biosynthesis of precious metabolites in callus cultures of *Eclipta alba* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 135:287–298, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1463-0>

KHURSHID, R.; ULLAH, M.A.; TUNGMUNNITHUMID, D.; DROUET, S.; SHAH, M.; ZAEEM, A.; HAMEED, S.; HANO, C.; ABBASI, B.H. ID1Ligands triggered differential accumulation of antioxidant and antidiabetic secondary metabolites in callus culture of *Eclipta alba* L. **PLOS ONE**, 2020 [doi.org/10.1371/journal.pone.0233963](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233963).

KIM, H.J.; LEE, Y.S. Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities. **Planta Med**, 71(9), 871-876, 2005.

LEE, J.Y.; SONG, D.; LEE, E.A.; JUNG, S.H.; NHO, C.W.; CHA, K.N.; PAN, C. Inhibitory Effects of 3,5-O-Dicaffeoyl-epi-quinic Acid from *Gymnaster koraiensis* on AKR1B10. **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.** 52(6): 731-734, 2009.

LEE, M.K.; HA, N.R.; YANG, H.Y.; SUNG, S.H.; KIM, Y.C. Stimulatory constituents of *Eclipta prostrata prostrata* on mouse osteoblast differentiation. **Phytotherapy research**, 23: 129-131, 2009.

LEE, M.K.; HA, R.N.; YANG, H.; SUNG, S.H.; KIM, G.H.; KIM, Y.C. Antiproliferative activity of triterpenes from *Eclipta prostrata* on hepatic stellate cells. **Phytomedicine**, 15: 775-780, 2008.

LI, F., ZHANG, B., CHEN, G., FU, X., 2017. The novel contributors of anti-diabetic potential in mulberry polyphenols revealed by UHPLC-HR-ESI-TOF-MS / MS. **Food Res. Int.** 100: 873–884, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.052>

LI, L.C.; KAN, L.D. Traditional chinese medicine for pulmonary fibrosis therapy: progress and future prospects. **Journal of Ethnopharmacology**, 198: 25-63, 2017.

LI, R., TAO M, WU T, ZHUO Z, XU T, PAN S, XU X. A promising strategy for investigating the anti-aging effect of natural compounds: a case study of caffeoylquinic acids. **Food Funct**, 12(18):8583-8593, 2021. [doi: 10.1039/d1fo01383a](https://doi.org/10.1039/d1fo01383a).

LIM, D.W.; PARK, J.; JUNG, J.; KIM, S.H.; UM, M.Y.; YOON, M.; KIM, Y.T.; HAN, D.; LEE, C.; LEE, J. Dicaffeoylquinic acids alleviate memory loss via reduction of oxidative stress in stress-hormone-induced depressive mice. **Pharmacol Res.** 161:105252, 2020. [doi: 10.1016/j.phrs.2020.105252](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105252).

LIU, W; NISAR, M.F.; WAN, C. Characterization of Phenolic Constituents from *Prunus cerasifera* Ldb Leaves. **Journal of Chemistry**, Article ID 5976090, 5 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5976090>

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas. (2008). 2° Edição. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa-SP, 394p.

MACIEL, G.; LOPES, A.A.; CANTREL, C.L.; FRANÇA, S.C.; BERTONI, B.W.; LOURENÇO, M.V. Jasmonates promote enhanced production of bioactive caffeoylquinic acid derivative in *Eclipta prostrata* (L.) L. hairy roots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02201-4>

MATOS, F.J.A. Plantas medicinais – guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. (2000). **Imprensa Universitária/Edições UFC**, Fortaleza, 344p.

McCOWN, B.H.; LLOYD, G. Woody Plant Medium (WPM) - A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. **HortScience**, 16: 453-453, 1981.

MIJANGOS-RAMOS, I.F.; ZAPATA-ESTRELLA, H.E.; RUIZ-VARGAS, J.A.; ESCALANTE-EROSA, F.; GÓMEZ-OJEDA, N.; GARCÍA-SOSA, K.; CECHINEL-FILHO, V.; MEIRA-QUINTÃO, N.L.; PENA-RODRÍGUEZ, L.M. Bioactive dicaffeoylquinic acid derivatives from the root extract of *Calea urticifolia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 28(3): 339-343, 2018.

MISHIMA, S.; YOSHIDA, C.; AKINO, S.; SAKAMOTO, T. Antihypertensive Effects of Brazilian Propolis: Identification of Caffeoylquinic Acids as Constituents Involved in the Hypotension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Biol. Pharm. Bull.** 28(10): 1909—1914, 2005.

MOREL, L.J.F.; AZEVEDO, B.C.; CARMONA, F.; CONTINI, S.H.T.; TELES, A.M.; RAMALHO, F.S.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; BORGES, M.C.; PEREIRA, A.M.S. A standardized methanol extract of *Eclipta prostrata* (L.) L. (Asteraceae) reduces bronchial hyperresponsiveness and production of Th2 cytokines in a murine model of asthma. **Journal of Ethnopharmacol.** 23;198:226-234, 2017.

MURASHIGE, T, SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, 15: 473-497, 1962.

NAM, S.; HAN, N.; RAH, S.; SEO, Y.; KIM, H.; JEONG, H. Anti-inflammatory effects of *Artemisia scoparia* and its active constituent, 3,5-dicaffeoyl-epi-quinic acid against activated mast cells. **Immunopharmacology and Immunotoxic**, 2017 <https://doi.org/10.1080/08923973.2017.1405438>

OH, J.H.; KARADENIZ, F.; LEE, J.I.; SEO, Y.; KONG, C. Protective effect of 3,5-dicaffeoyl-epi-quinic acid against UVB-induced photoaging in human HaCaT keratinocytes. **Molecular Medicine REPORTS** 20: 763-770, 2019.

OH, J.H.; LEE, J.I.; KARADENIZ, F.; PARK, S.Y.; SEO, Y.; KONG, C. Antiphotaging Effects of 3,5-Dicaffeoyl-epi-quinic Acid via Inhibition of Matrix Metalloproteinases in UVB-Irradiated Human Keratinocytes. **Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** Volume 2020, Article ID 8949272, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2020/8949272>

OH, J.H.; LEE, J.I.; KARADENIZ, F.; SEO, Y.; KONG, C. 3,5-Dicaffeoyl-Epi-Quinic Acid Isolated from Edible Halophyte *Atriplex gmelinii* Inhibits Adipogenesis via AMPK/MAPK Pathway in 3T3-L1 Adipocytes. **Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** Volume 2018, Article ID 8572571, 8 pages <https://doi.org/10.1155/2018/8572571>

PEÑUELAS, J.; MUNNÉ-BOSCH, S. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. **Trends Plant Sci** 10: 166–169, 2005.

PERIĆ, R.; RILAK, S. *Eclipta prostrata* (L.) L. (Compositae), an adventive species new to the flora of Serbia. **Botânica Serbia** 41(1): 89-93, 2017.

PRAKASH, P.; SHARUMATHY, D.; NANDAGOPAL, S.S.D.; NARENDRAKUMAR, G. Micropropagation of *Eclipta alba* using humic acid as media component. **Plant Archives** 15(1): 181-185, 2015.

RAY, A.; BHATTACHARYA, S. An improved micropropagation of *Eclipta alba* by in vitro priming with chlorocholine chloride. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** 92:315–319, 2008. DOI 10.1007/s11240-007-9328-y

RAY, A.; BHATTACHARYA, S. Storage and conversion of *Eclipta alba* synseeds and RAPD analysis of the converted plantlets, **Biologia Plantarum**, 54:547-550, 2010,.

ROBINSON, W.E.J.; REINECKE, M.G.; ABDEL-MALEK, S.; JIA, Q.; CHOW, S.A. Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. **Proc Natl Acad Sci** 93:6326–6331, 1996.

RUSCHEL, A. R.; NODARI, R. O.; Moerschbacher, B. M.; RYU, S.; SHIN, J.; JUNG, J.Y.; CHO, Y; KIM, S.J.; JANG, D.S.; LEE, K. Echinocystic acid isolated from *Eclipta prostrata* suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS, TNF- $\alpha$ , and IL-6 expressions via NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 macrophages. **Planta medica**, 79:1031-1037, 2013.

RYU, K.J.; YOO, M.S.; SEO, Y.; YOON, K.W.; KIM, H. M.; JEONG, H.J. Therapeutic effects of *Artemisia scoparia* Waldst. et Kitaib in a murine model of atopic dermatitis. **CLINICAL and Experimental Dermatology**. doi:10.1111/ced.13565, 2018.

SAHA, D.; MARBLE, S.C.; TORRES, N.; CHANDLER, A. Fertilizer placement affects growth and reproduction of three common weed species in pine bark–based soilless nursery substrates. **Weed Science** 67(6): 682-688, 2019.

SALMA, U.; KUNDU, U.S.; ALI, M.D.N.; MANDAL, N. Elicitor mediated enhancement of wedelolactone in cell suspension culture of *Eclipta alba* (L.) Hassk. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1431-8>

SALMA, U; KUNDU, U.S.; HAZRA, A.K.; ALI, M.N.; MANDAL, N. Augmentation of wedelolactone through in vitro tetraploid induction in *Eclipta alba* (L.) Hassk. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 133:289–298, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1381-1>

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**,30(3):507-512, 1974.

SEO, Y.J.; KIL, H.W.; RHO, T.; YOON, K.D. A New Coumestan Glucoside from *Eclipta prostrata*. **Natural Product Sciences** 26(4):289-294, 2020. <https://doi.org/10.20307/nps.2020.26.4.289>

SINGH, A.; DUGGAL, S.; SUTTE, A.; SINGH, J.; KATEKHAYE, S. *Eclipta alba* Linn. – Ancient remedy with therapeutic potential. **Internacional journal of phytopharmacology** 1(2):57-63, 2010.

SINGH, S.K.; RAI, M.K.; ASTHANA, P.; SAHOO, L. Alginate-encapsulation of nodal segments for propagation, short-term conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* (L.). **Acta Physiol Plant** 32:607–610, 2010.

SINGH, S.K.; RAI, M.K.; SAHOO, L. An improved and efficient micropropagation of *Eclipta alba* through transverse thin cell layer culture and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Industrial Crops and Products**, 37: 328-333, 2012.

TABASSUM, N.; AGRAWAL, S.S. Hepatoprotective activity of *Eclipta alba* Hassk against paracetamol induced hepatocellular damage in mice. **Experimental Medicine** 11(4): 278-280, 2004.

TATTINI, M.; GRAVANO, E.; PINELLI, P.; MULINACCI, N.; ROMANI, A. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. **New Phytol.** 148(1):69-77. 2000.

TATTINI, M.; GUIDI, L.; MORASSI-BONZI, L.; PINELLI, P.; REMORINI, D.; DEGL'INNOCENTI, E.; GIORDANO, C.; MASSAI, R.; AGATI, G. On the role of flavonoids in the integrated mechanisms of response of *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* to high solar radiation. **New Phytol.** Aug;167(2):457-70, 2005.

THAKUR, V.D.; MENGI, S.A. Neuropharmacological profile of *Eclipta alba* (Linn) Hassk. **Journal of ethnopharmacology**, 102: 23-31, 2005.

TIMALSINA, D.; DEVKOTA, H.P. *Eclipta prostrata* (L.) L. (Asteraceae): Ethnomedicinal Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities. **Biomolecules** 11:1738, 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11111738>.

UPADHAY, R.K.; PANDEY, M.B.; JHA, R.N.; PANDEY, V.B. Eclalbatin, a triterpene saponin from *Eclipta alba*. **Journal of asian natural products research** 3(1), 2001. VARSHNEY, S.P.; SHARMA, B.D. Responses of saline and non.saline populations of *Eclipta alba* to soi salinity. **Can. J. Planr Sci.** 59: 539-540 1979.

WAGNER, H.; GEYER, B.; YOSHINOBU, K.; GOVIND, S.R. Coumestans as the main active principles of the liver drugs *Eclipta alba* and *Wedelia calendulacea*. **Planta medica** 5: 370-372, 1986.

WANG, L.; HUANG, B.; LI, C.; YANG, B.; JIA, X.; FENG, L. The combination of HPLC and biological analysis to determine the quality markers and its structural composition of *Eclipta prostrata* L. **Phytochemical Analysis** 1–14, 2020.

WANG, W.; HE, H.; ZUO, N.; HE, H.; PENG, H.; TAN, X. Synthesis and Herbicidal Activity of 2-(Substituted phenoxyacetoxy)alkyl-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphinan-2-one **J. Agric. Food Chem.** 60(31): 7581–7587, 2012.

WEI, F.; FURIHATA, K.; HU, F.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 48(11):857-865, 2010.

ZAFAR, R.; SAGAR, B.P.S. In vitro plant regeneration of *Eclipta alba* and increased production of coumestans. **Fitoterapia** 70: 348-356, 1999.

ZHAO, Y.; PENG, L.; LUA, W.; WANG, Y.; HUANG, X.; GONG, C.; HE, L.; HONG, J.; WU, S.; JIN, X. Effect of *Eclipta prostrata* on lipid metabolism in hyperlipidemic animals. **Experimental Gerontology** 62: 37-44, 2015.