

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**Ácido salicílico como elicitor abiótico no cultivo *in vitro*  
de plantas de *Alternanthera tenella* Colla**

**Isabel Rodrigues Brandão**

Pelotas, 2012

**ISABEL RODRIGUES BRANDÃO**

**Ácido salicílico como elicitor abiótico no cultivo *in vitro* de plantas de *Alternanthera tenella* Colla**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Co-orientadores: Prof. Dr. José Antonio Peters

Prof. Dr. Luciano do Amarante

Pelotas, fevereiro de 2012

**Dados de catalogação na fonte:**  
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

B817a Brandão, Isabel Rodrigues

Ácido salicílico como elicitor abiótico no cultivo *in vitro* de plantas de *Alternanthera tenella* colla / Isabel Rodrigues Brandão ; orientador Eugenia Jacira Bolacel Braga; co-orientadores José Antonio Peters e Luciano do Amarante - Pelotas,2012.49f. : il..- Dissertação (Mestrado ) –Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Apaga-fogo 2.Betacianina 3.Compostos fenólicos  
4.DPPH I.Braga, Eugenia Jacira Bolacel(orientador) II.  
Título.

CDD 581.151

**Banca Examinadora:**

Dr<sup>a</sup>. Eugenia Jacira Bolacel Braga (Orientadora)

Dr<sup>a</sup>. Elizete Beatriz Radmann

Dr<sup>a</sup>. Márcia Vaz Ribeiro

Dr. Márcio Paim Mariot

Aos meus pais e  
ao meu amado marido

**Dedico**

As minhas irmãs e sobrinho

**Ofereço**

## **Agradecimentos**

Acima de tudo, agradeço a Deus por nos dar a vida!

Ao meu amado marido Pedro, pelo seu incansável apoio, puxões de orelha, e por compreender minha ausência em alguns momentos em que me dediquei à conclusão deste trabalho, e obrigada pelo seu amor e companheirismo, até virou meu “estagiário” mais dedicado, me dando forças para enfrentar as dificuldades ao longo do caminho. Te amo demais!

Agradeço aos meus pais, Tomaz e Elcar, minhas irmãs, Tatiana e Luciana e ao meu sobrinho Henrique, pelo amor e amizade que sempre me proporcionaram, e pelo incentivo ao longo dos anos. Amo vocês.

A minha orientadora Eugenia Jacira Bolacel Braga, por toda dedicação, confiança e por todo tempo que cedeu para a elaboração deste trabalho.

Ao professor Luciano do Amarante pela sua paciência e ensinamentos. Muito Obrigada! E ao Prof. José Antonio Peters pelos ensinamentos em cultura de tecidos.

Agradeço também de todo coração minha colega de curso Milene Lima, por todo apoio e ensinamentos das metodologias que fizeram possível parte deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas por todos estes anos de convivência e pela colaboração prestada mesmo que inconscientemente, seja por meio de informações, seja por meio das reflexões provocadas.

Gostaria de um agradecimento especial a quatro colegas de laboratório e amigos que foram muito importantes para a realização deste trabalho: Alícia Kleinowski, Andressa Reis, Andersom Einhardt e Priscila Auler. Muito Obrigada!!!!

A minha ex-colega de laboratório e leal amiga Márcia Ribeiro, por todos os ensinamentos e conversas.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

RODRIGUES-BRANDÃO, Isabel. Ácido salicílico como elicitor abiótico no cultivo *in vitro* de plantas de *Alternanthera tenella* Colla. 2012. 48f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

*Alternanthera tenella* Colla, (Amaranthaceae), popularmente conhecida como apaga-fogo, apresenta compostos bioativos como betacianina e compostos fenólicos, sendo utilizada na medicina popular como diurético, anti-inflamatório e antitérmico. O uso de elicitores aliados à cultura de tecidos é uma alternativa para promover alterações no metabolismo secundário das plantas, pois pode estimular a produção de compostos biologicamente ativos, porém pode tornar-se prejudicial ao crescimento da planta. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do ácido salicílico sobre o crescimento de plantas de *A. tenella* cultivadas *in vitro* e verificar seu potencial para otimizar a produção de compostos fenólicos, flavonoides e betacianinas, bem como verificar a capacidade antioxidante dos extratos das plantas. Para isso, em um primeiro experimento, segmentos nodais foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações de ácido salicílico (0, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{M}$ ) onde permaneceram por 35 dias. As plantas foram avaliadas quanto ao crescimento e às concentrações de betacianinas e compostos fenólicos totais quando expostas as diferentes concentrações do elicitor. Separadamente, em um segundo experimento, as plantas cresceram no substrato vermiculita acrescido de meio MS líquido e após 35 dias foram expostas a concentração de 400  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico por 0, 12, 36 e 48-h. Após esse período foram quantificados os compostos bioativos (betacianina, fenóis totais e flavonoides totais) e verificada a capacidade antioxidante de forma não-enzimática das plantas submetidas aos tratamentos. Em relação às variáveis de crescimento o elicitor mostrou-se visivelmente prejudicial, ocorrendo diminuição das médias já na menor concentração utilizada (100  $\mu\text{M}$ ). A concentração de 300  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico promoveu o aumento na quantidade de betacianina e compostos fenólicos totais, chegando a 366% e 180%, respectivamente, em relação ao controle. O tempo de 36-h de exposição das plantas ao ácido salicílico resultou nas maiores médias tanto para teor de betacianina, como para compostos fenólicos totais. Já para flavonoides totais, os maiores tempos de exposição (36 e 48-h) ao elicitor apresentaram as menores médias, diferindo do controle e das 12-h de exposição. Os extratos de folhas de apaga-fogo apresentaram maior capacidade antioxidante quando submetidas a 36 e 48-h de exposição ao ácido salicílico. Com base nos resultados pode-se concluir que o uso do elicitor no meio de cultura é desfavorável ao crescimento das plantas de *A. tenella in vitro*, porém aumenta de forma significativa a produção dos compostos de interesse deste estudo, assim como a capacidade antioxidante dos extratos das plantas.

Palavras chave: apaga-fogo, betacianina, compostos fenólicos, DPPH.



## ABSTRACT

RODRIGUES-BRANDÃO, Isabel. Salicylic acid as abiotic elicitor on culture in vitro of *Alternanthera tenella* Colla. 2012. 48f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

*Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae), popularly known as "apaga-fogo", presents bioactive compounds as betacyanin and phenolic compounds being utilized in folk medicine as diuretic, anti-inflammatory and antipyretic. The use of elicitors allies with the tissue culture is an alternative to promote changes in secondary metabolism of plants, because it can stimulate the production of biologically active compounds, but may become harmful to plant growth. This present work aimed to evaluate the influence of salicylic acid on the growth of plants of *A. tenella* cultivated in vitro and verify their potential to optimize the production of phenolic compounds, flavonoids and betacyanin, and to verify the antioxidant capacity of the plant extracts. For this, in a first experiment, nodal segments were inoculated in MS medium with different concentrations of salicylic acid (0, 100, 200, 300 and 400  $\mu\text{M}$ ) where they remained for 35 days. The plants were evaluated for growth and betacyanin concentrations and of total phenolic compounds when exposed to different concentrations of elicitors. Separately, in a second experiment, the plants grown up on the vermiculite substratum plus of MS liquid medium and after 35 days were exposed to concentration 400  $\mu\text{M}$  of salicylic acid for 0, 12, 36 and 48-h. After this period were quantified the bioactive compounds (betacyanin, total phenols and total flavonoids) and verified the antioxidant capacity in a non-enzyme from plants subjected to treatments. In relation to growth variables the elicitors was shown to be visibly harmful, occurring decreased of mean already on the lowest concentration used (100  $\mu\text{M}$ ). The concentration of 300  $\mu\text{M}$  salicylic acid promoted an increase in the quantity of betacyanin, as for total phenolic compounds, reaching 366% and 180% respectively compared to control. The time of 36 hours of exposure of plants to salicylic acid resulted in the largest mean both betacyanin content of, as for total phenolic compounds. Now for total flavonoids, the highest exposure times (36 and 48-h) the elicitors had the lowest averages, differing from control and of 12-h of exposure. The extracts of leaf of "apaga-fogo" presented higher antioxidant capacity when subjected to 36 and 48-h of exposure to salicylic acid. Based on the results we can conclude that the use of elicitors in the culture medium is unfavorable to the growth of plants of *A. tenella* in vitro, however increases of form significantly the production of compounds of interest in this study, well as the antioxidant capacity of the plant extracts.

Key-words: "apaga-fogo", betacyanin, phenolic compounds, DPPH.

## SUMARIO

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	13
2.1 Plantas Medicinais .....	13
2.2 Gênero <i>Alternanthera</i> .....	14
2.3 Betalaínas .....	15
2.4 Compostos Fenólicos .....	16
2.5 Cultura <i>in vitro</i> e Elicitores .....	16
2.6 Ácido salicílico .....	17
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19
ARTIGO 1- REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS .....	24
RESUMO .....	24
ABSTRACT .....	25
INTRODUÇÃO .....	26
MATERIAL E MÉTODO .....	27
RESULTADOS .....	29
REFERÊNCIAS .....	34
ARTIGO 2: ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM .....	38
Resumo .....	38
Abstract .....	38
Introdução .....	39
Material e Métodos .....	40
Material vegetal e tratamento com ácido salicílico .....	40
Quantificação de betacianina .....	41

Quantificação de compostos fenólicos totais.....	41
Quantificação de flavonoides totais.....	42
Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	42
Delineamento experimental e análise estatística .....	42
Resultados .....	43
Quantificação de betacianina .....	43
Quantificação de compostos fenólicos .....	43
Atividade antioxidante .....	45
Discussão.....	45
Conclusões.....	47
Referências .....	47

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Muitas espécies são utilizadas tradicionalmente para a cura de diversas enfermidades, tornando-se potenciais modelos para a síntese de novos fármacos. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) metade dos medicamentos mais vendidos no mundo tem origem em produtos naturais de plantas e um grande número de compostos químicos, produzidos pelas plantas, é utilizado pelas indústrias alimentícias, cosméticas e principalmente na medicina (SOUSA et al., 2008).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos e taninos, têm sido objeto de estudos, sendo os metabólitos secundários fontes de medicamentos, aditivos alimentares, aromas e outros materiais industriais ou como parte de um produto final ou como matéria-prima (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

O caso mais notório é do ácido acetilsalicílico, a aspirina<sup>®</sup>, descoberto em pesquisas com o salgueiro branco (*Salix Alba* L.). Longe dos modernos laboratórios, os índios norte-americanos já o usavam para aliviar a dor e a febre (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Alternanthera* demonstraram a presença de flavonoides, antraquinonas, cromoalcaloides, betalainas, saponinas, triterpenos, esteroides, entre outros, responsáveis por várias atividades medicinais (SALVADOR; DIAS, 2004; SILVA et al., 2005). Dentre as espécies de *Alternanthera* destaca-se a *Alternanthera tenella* Colla, uma planta herbácea, largamente encontrada no Brasil, utilizada na medicina popular como anti-inflamatória e antibacteriana (REGO, 1995; SILVEIRA; OLEA, 2009.).

A demanda excessiva por certos recursos naturais ocasiona a escassez destes, fazendo com que muitas espécies, por serem exploradas, sem nenhuma restrição, se extingam do nosso ecossistema (SILVA; BUITRON; OLIVEIRA, 2001). Em plantas medicinais, a micropropagação auxilia na conservação do germoplasma, como também na produção de mudas homogêneas e de qualidade, além de auxiliar

na seleção e melhoramento de genótipos com potencial para serem utilizados pela indústria farmacêutica (RAO; RAVISHANKAR, 2002). Técnicas de cultura de tecidos permite um rápido aumento no número de plantas geneticamente idênticas a partir de plantas selecionadas, possibilitando assim a produção de mudas durante o ano todo e a formação de plantas com elevada qualidade sanitária (SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001).

Elicitores bióticos e abióticos vêm sendo amplamente empregados em cultura de tecidos vegetais, com o intuito de maximizar a produção de compostos químicos de interesse. A submissão de plantas a estresses abióticos tem sido apontada como estimulador da biossíntese de metabólitos secundários incluindo terpenos, flavonoides, alcaloides, betacianinas e fenilpropanoides, entre outros (BHUIYAN; ADACHI, 2003; ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

No passado, os metabólitos secundários eram vistos como produtos de desperdício resultantes de enganos do metabolismo primário, porém já está claro que os metabólitos secundários são componentes chaves em diversos mecanismos ecológicos vegetais e muitos são de fundamental importância na defesa das plantas (HARBONE, 2003).

Existe um grande interesse no estudo dos compostos antioxidantes, como as betacianinas e os compostos fenólicos, por serem substâncias que em pequenas quantidades podem prevenir e apresentar alto potencial terapêutico de doenças causadas por radicais livres, tais como: artrite, choque hemorrágico, doenças cardíacas, catarata, disfunções cognitivas, envelhecimento e câncer (NOGUCHI; NIKI, 2000). Estas observações têm estimulado a busca de novas substâncias fitoquímicas com potencial antioxidante.

A presente dissertação teve como objetivo avaliar o crescimento e quantificar os compostos antioxidantes em plantas de *Alternanthera tenella* crescidas *in vitro* em meio contendo diferentes concentrações de ácido salicílico, bem como a quantificação de compostos bioativos e a capacidade antioxidante de forma não-enzimática de plantas expostas ao mesmo elicitor por diferentes tempos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas Medicinais

Planta medicinal é definida como sendo todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos (VEIGA Jr; PINTO; MACIEL, 2005). Estas substâncias estão relacionadas aos metabólitos gerados pelo vegetal em seu ciclo vital, com ênfase para os metabólitos secundários, os quais são utilizados principalmente pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias (SOUSA et al., 2008).

A busca por substâncias capazes de prevenir, amenizar e curar vem desde os primórdios da existência humana. O homem sempre buscou na natureza aquilo que lhe faltava, quer fosse saúde, alimento, proteção ou riquezas. As informações sobre as plantas utilizadas para a cura de enfermidades e a forma empregada (inicialmente as tinturas, cataplasmas, infusões) foram passadas de geração em geração ao longo da história da humanidade (BALUNAS; KINGHORN, 2005; GURIB-FAKIM, 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, dependem de plantas e seus derivados para cuidados primários da saúde (BALUNAS; KINGHORN, 2005; GURIB-FAKIM, 2006).

O uso das plantas envolveu o isolamento de compostos ativos, tendo iniciado com o isolamento da morfina no início do século XIX e posteriormente da cocaína, codeína, digoxina, quinina e outros usados até hoje na prática médica. Esta grande diversidade de estruturas químicas das plantas corresponde aos metabólitos secundários especializados, envolvidos na relação do organismo com o meio ambiente, atuando, por exemplo, como produtos de sinalização, substância de defesa contra predadores e parasitas, ou na resistência contra pragas e doenças (DIXON, 2001; PIETERS; VLIETINCK, 2005).

Muitos autores apontam que os metabólitos secundários apresentam características de grande diversidade química, especificidade bioquímica e propriedades comuns aos produtos naturais. Essas características mostram ser extremamente relevantes na descoberta de novos medicamentos e servem para diferenciá-los dos compostos sintéticos (KOEHN; CARTER, 2005; PATERSON; ANDERSON, 2005).

Um grande número de compostos químicos produzidos pelas plantas vem sendo amplamente utilizado pela indústria farmacêutica e alimentícia, sendo que cerca de 25% do genoma vegetal especifica rotas de biossíntese destes compostos (PICHERSKY; GANG, 2000).

## **2.2 Gênero *Alternanthera***

O gênero *Alternanthera* pertence à família Amaranthaceae, compreendendo cerca de 170 gêneros e 2000 espécies, ocorrendo no Brasil 20 gêneros e 100 espécies. Muitas destas espécies são utilizadas como ornamentais ou na medicina popular, sendo comumente encontradas em ambientes abertos, porém algumas espécies são encontradas no interior de florestas (SOUZA; LORENZI, 2005).

Estudos realizados por Marchioretto et al. (2008) mostraram que o Rio Grande do Sul apresenta 11 gêneros e 43 espécies de plantas dessa família, sendo o gênero *Alternanthera* o mais representativo, com 11 espécies.

Plantas desse gênero são conhecidas por possuírem propriedades antimicrobianas e antivirais e em algumas espécies deste gênero têm sido reportada a inibição da atividade linfocitária, propriedades antivirais e hepatoprotetoras e atividade analgésica (FERREIRA et al., 2003). Possuem compostos biologicamente ativos conhecidos, entre eles, betalaínas (betacianinas e betaxantinas), ecdisteroides, flavonoides, saponinas e triterpenos (FERREIRA; DIAS, 2000).

*Alternanthera tenella* Colla é uma planta herbácea, comumente conhecida como “apaga-fogo” (FERREIRA et al., 2003) ou “perpétua do mato” (GUERRA et al., 2003), frequentemente encontrada em todo o Brasil, inclusive em lavouras de soja e arroz, onde é considerada uma planta daninha (SIQUEIRA, 1995), ocorrendo um controle extensivo com o uso de herbicidas, e por isso é considerada uma planta vulnerável a extinção (Decreto 42.099, 2002).

Na medicina popular é utilizada por via oral, na forma de infusão, no tratamento de inflamações e infecções (BIELLA et al., 2008; REGO, 1995), apresentando atividades biológicas como antibacteriana e antifúngica (SALVADOR et al., 2003). Salvador et al. (2006) comprovaram ação antioxidante de extrato etanólico desta planta, isolando seis diferentes flavonoides.

Já Silveira; Olea (2009) obtiveram resultados que comprovaram o uso popular das plantas de apaga-fogo na forma de infuso no tratamento de leucorréia vaginal. A espécie mostrou significativa atividade antibacteriana *in vitro*, contra várias cepas bacterianas de interesse na medicina humana. Estudos com extrato aquoso desta planta comprovaram sua atividade imunomodulatória (GUERRA et al., 2003).

### **2.3 Betalaínas**

As betalaínas são compostos nitrogenados (N-heterocíclicos), solúveis em água, localizados nos vacúolos das plantas, sendo sua ocorrência restrita a 10 famílias da classe Caryophyllales, entre elas a família Amaranthaceae (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; LOPEZ, 2000, CAI; SUN; CORKE, 2005).

A estrutura geral das betalaínas contém o ácido betalâmico acompanhado de um radical R1 ou R2. A variação desses grupos é em função das diferentes fontes de onde podem ser obtidos esses pigmentos e determinam sua tonalidade e estabilidade. Desta forma, as betalaínas podem ser divididas em dois grupos estruturais: as betacianinas (vermelho ao vermelho violeta) e as betaxantinas (amarelo), sendo as betacianinas classificadas em quatro tipos diferentes, em função da estrutura química: betanina, amarantina, gonferina e boungainvilina (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

O interesse por esses pigmentos cresceu desde que sua atividade anti-radical foi caracterizada, passando a ser amplamente utilizada como aditivo para produtos alimentícios, fármacos e cosméticos devido as suas propriedades colorantes naturais e ausência de toxicidade (STRACK; VOGT; SCHLIEMANN, 2003).



## 2.4 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos, ou fenilpropanoides, são amplamente encontrados em plantas, sendo um grupo muito diversificado de fitoquímicos, originados do metabolismo secundário das plantas, derivados de fenilalanina e tirosina, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos e radiações UV (NACZK; SHAHIDI, 2004), além de atuarem como agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil compostos fenólicos, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI; NACZK, 1995). Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal e vêm atraindo a atenção dos pesquisadores devido ao seu potencial como antioxidantes naturais (KURKIN, 2003; KOSAR et al., 2004), recebendo destaque os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (KING; YONG, 1999).

Estas moléculas atuam como detoxificadora de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (SOKMEN et al., 2005), agindo na prevenção de doenças que envolvam a ação de radicais livres e a oxidação de lipoproteínas, como problemas cardiovasculares, arteriosclerose e trombose (WANG; ZHANG, 2005).

## 2.5 Cultura *in vitro* e Elicitores

Técnicas, como a de cultura de células e tecidos, têm sido utilizadas para melhorar a produtividade de compostos de interesse nos vegetais, incluindo a seleção de linhagens, otimização das condições de cultivo, uso de elicitores e engenharia metabólica (CHEN; CHEN, 2000).

A técnica de cultura de células e tecidos vegetais é de grande aplicação para o desenvolvimento de pesquisas em diversas áreas do conhecimento, como: produção de mudas, manipulação de material vegetal, para melhoramento de culturas, produção de calos, produção de metabólitos bioativos, ou ainda para o estudo de vias de síntese (TROMPE, 2007). Além disso, permite utilizar elicitores (agentes químicos e estressantes), para alterar as rotas metabólicas afetando qualitativamente e quantitativamente as moléculas bioativas produzidas (DJILIANOV et al., 2005).

O efeito dos elicitores depende de muitos fatores, tais como: concentração, tempo de elicitação e o estágio de crescimento da cultura no momento da estimulação. Estas moléculas podem ser endógenas ou exógenas, dependendo de como atuam no vegetal, e bióticas ou abióticas, dependendo de sua origem (DÖRNENBURG; KNORR, 1996).

Trabalhos têm mostrado relatos da utilização de elicitores para controle de fitopatógenos, produção e aumento de síntese de vários metabólitos vegetais, neste sentido, pesquisas com *Atropa belladonna* e *Lithospermum erythrorhizon* utilizando ácido salicílico como elicitor, apresentaram bons resultados quanto à produção de metabólitos com propriedades terapêuticas (LEE et al., 2001, YAMAMOTO; INQUE; YAZAKI, 2000), assim como Perotti et al. (2010) em trabalho realizado com *A. philoxeroides* obtiveram um aumento de 60% de betacianinas em plantas elicidadas com 175 µM de sulfato de cobre *in vitro*.

Em função das condições em que se encontram as células em cultura e dos estímulos recebidos, elas passarão a produzir, em maior ou menor escala, produtos do seu metabolismo secundário, muitos deles de grande interesse farmacêutico. Os metabólitos secundários vegetais apresentam grande valor do ponto de vista social e econômico, assim diversas estratégias têm sido empregadas visando aumentar os valores de produtividade de compostos bioativos em sistemas de cultura de células e tecidos vegetais (MARASCHIN et al., 2002).

## 2.6 Ácido salicílico

O ácido salicílico é um fitohormônio pertencente ao grupo bastante diversificado dos compostos fenólicos, sintetizado via fenilpropanóide, a partir da L-fenilalanina, que, por ação da fenilalanina amônio-liase (PAL), origina o ácido trans-

cinâmico. A aplicação do ácido salicílico pode inibir a germinação e o crescimento da planta, interferir na absorção das raízes, reduzir a transpiração, causar a abscisão das folhas, alterar o transporte de íons, induzindo uma rápida despolarização das membranas, ocasionando um colapso no potencial eletroquímico (KERBAUY, 2008).

A aplicação exógena nas plantas também pode desencadear rotas fundamentais para o crescimento e o desenvolvimento, bem como a expressão de genes relacionados à defesa, produzindo compostos como alcaloides e polifenóis, resultando na defesa, proteção e resistência aos patógenos, sendo considerado um elicitador abiótico (YAO; TIAN, 2005).

O ácido salicílico pode regular a via de formação dos flavonoides, sendo considerado por alguns autores como um fitohormônio envolvido nas reações de defesa da planta, induzindo a resposta sistêmica adquirida (CURTIS et al. 2004). Além de desencadear tais respostas, também está envolvido na ativação de genes relacionados a respostas de estresse a seca, ao frio, ao calor, a salinidade e a radiação UV (PENG; JIANG 2006).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Science**, v.78, p.431–441, 2005.

BHUIYAN, N.H.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal Plant Physiology**, v.160, p.1117-1124, 2003.

BIELLA, C.A.; SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A.; DIAS-BARUFFI, M.; PEREIRA-CROTT, L.S. Evaluation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects and phytochemical screening of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aqueous extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.6, p.569-577, 2008.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v.56, p.317-333, 1998.

CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae*. **Trends in Food Science & Technology**, n.16, p.370-376, 2005.

CHEN, H.; CHEN, F. Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhizacells* in suspension culture. **Process Biochemistry**, v.35, p.837-840, 2000.

CURTIS, H.; NOLL, U.; STORMANN, J.; SLUSARENKO, A.J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.65, n.2, p.79-89, 2004.

DECRETO n.º 42.099, de 31 de dezembro de 2002. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. **Palácio Piratini**, Porto Alegre, 2002.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R.; LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v.40, n. 3, p.173-289, 2000.

DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v.411, p.843-847, 2001.

DJILIANOV, D.; GENOVA, G.; PARVANOV, D.; ZAPRYANOVA, N.; KONSTANTINOVA, T.; ATANASSOV, A. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlearthodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.80, p.115-118, 2005.

DORNENBURG, H.; KNORR, D. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Science**, v.15, p.141-168, 1996.

FERREIRA, E.A.; PROCÓPIO, S.O.; SILVA, E.A.M.; SILVA, A.A.; RUFINO, R.J.N.; Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV – *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.263- 271, 2003.

FERREIRA, E.O.; DIAS, D.A. A methyllene dioxy flavonol from aerial parts of *Blutaparon portulacoides*. **Phytochemistry**, v.53, p.145-147, 2000.

GUERRA, R.N.M.; PEREIRA, H.A.W.; SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G. Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.1215-1219, 2003.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.91–93, 2006.

HARBONE, J.B. Plant secondary metabolism. In: CRAWLEY, M.J. (ed.) **Plant Ecology**, 2<sup>a</sup> ed., Blackwell Publishing, 2003. p.132-155.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Guanabara: Koogan, 2008. 452 p.

KING A, YOUNG G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v.50, n.2, p.213-218, 1999.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug Discovery. **Nature Review Drug Discovery**, v.4, n.3, p.206-220, 2005.

KOSAR, M.; DORMAN, D.; BASER, K.; HILTUNEN, R. An improved HPLC post-column methodology for the identification of free radical scavenging phytochemicals in complex mixtures. **Chromatographia**, v.60, p.635-638, 2004.

KURKIN, V.A. Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v.39, n.2, p.123-153, 2003.

LEE, K.; HIRANO, H.; YAMAKAWA, T.; KODAMA, T.; IGARASHI, Y.; SHIMOMURA, K. Responses of transformed root culture of *Atropa belladonna* to salicylic acid stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.91, n.6, p.586-589, 2001.

LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.131-137, 2005.

MARASCHIN, M.; SUGUI, J.A.; WOOD, K.V.; BONHAN, C.; BUCHI, D.F.; CANTAO, M.P.; CAROBREZ, S.G.; ARAUJO, P.S.; PEIXOTO, M.L.; VERPOORTE, R.; FONTANA, J.D. Somaclonal variation: a morphogenetic and biochemical approach in

*Mandevilla velutina* cultured cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.633-643, 2002.

MARCHIORETTO, M.S.; AZEVEDO, F.; JOSENDE, M.V.F.; SCHNORR, D.M. Biogeografia da família Amaranthaceae no Rio Grande do Sul. **Pesquisas, Botânica**, n.59, p.171-190, 2008.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.411-424, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.95-111, 2004.

NOGUCHI, N.; NIKI, E. Forum: Therapeutic Applications of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Human Disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.28, p.1538–1546, 2000.

PATERSON, I.; ANDERSON, E.A. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. **Science**, v.310, p.451-453, 2005.

PENG, L.; JIANG, Y. 2006. Exogenous salicylic acid inhibits browning of fresh-cut Chinese water chestnut. **Food Chemistry**, v.94, n.4, p.535-540, 2006.

PEROTTI, J.C.; RODRIGUES, I.C.S.; KLEINOWSKI, A.M.; RIBEIRO, M.V.; EINHART, A.M.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A.; BRAGA, E.J.B. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, v.40, p.1874-1880, 2010.

PICHERSKY, E.; GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, v.5, n. 10, p.439-445, 2000.

PIETERS, L., VLIETINCK, A.J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.57–60, 2005.

RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.20, p.101-153, 2002.

REGO, T.J.A. **Fitogeografia das Plantas Medicinais no Maranhão**, 2.ed. São Luís: EDUFMA, 1995. 133p.

SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima*(Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.107-110, 2004.

SALVADOR, M.J.; FERREIRA, E.O.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; De CASTRO, W. V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D.A. Isolation and HPLC

quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift fur Naturforsch**, v.61c, p.19-25, 2006.

SALVADOR, M.J.; FERREIRA, J.C.; ZULETA, L.M.C.; BOLZANI, V.S.; DIAS, D.A.; CANDIDO, R.C. Antifungal susceptibility tests of crude extracts from *Alternanthera maritima*, *A. tenella* Colla and *Calycophyllum spruceanum* Benth against four *Candida* SSP determined by agar-well diffusion and Broth macrodilution methods. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v.39, p.235- 240, 2003.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba, RS: Agropecuária, 2001. p.25-75.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic; 1995. 331p.

SILVA, N.C.B.; MACEDO, A.F.; LAGE, C.L.S.; ESQUIBEL, M.A.; SATO, A. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana*(L.) Kuntze cultured *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.779-786, 2005.

SILVA, S.R.; BUITRON, X.; OLIVEIRA, L.H. **Plantas Medicinais do Brasil**: aspectos gerais sobre legislação. Quito: Traffic América do Sul-IBAMA, 2001. 44p.

SILVEIRA, L.M. da S., OLEA, R.S.G. Isolamento de compostos com atividade antibacteriana em *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.90, n.2, p.148-153, 2009.

SIQUEIRA, J.C. Phytogeography of brasilian Amaranthaceae. **Pesquisa Botânica**, v.4, p.5-21, 1995.

SOKMEN, M.; ANGELOVAB, M.; KRUMOVA, E.; PASHOVA, S.; IVANCHEVA, S.; SOKMEN, A.; SERKEDJIEVA, J. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. **Life Sciences**, v.76, p.2981–2993, 2005.

SOUSA, F.C.; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; CAVALCANTE, F.H.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; VIANA, G.S.S. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p.642-654, 2008.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.1.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v.62, p.247-269, 2003.

TROMPE, T.A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v.37, n.2, p.80-169, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, p.519-528, 2005.

VIEGAS, C.J.R.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n. 2, p.326-337, 2006.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v.20, p.157-166, 2009.

WANG, L.; ZHANG, H. A theoretical study of the different radical-scavenging activities of catechin, quercetin, and a rationally designed planar catechin. **Bioorganic Chemistry**, v.33, p.108-115, 2005.

YAMAMOTO, H.; INOUE, K.; YAZAKI, K. Caffeic acid oligomers in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. **Phytochemistry**, v.53, p.651-657, 2000.

YAO, H.; TIAN, S. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. **Postharvest Biology and Technology**, v.35, p.253-262, 2005.

ZHAO, J.T.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.23, p.283-333, 2005.



## ARTIGO 1- REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

### Ácido salicílico no cultivo *in vitro* de *Alternanthera tenella* Colla e sua capacidade elicitora

RODRIGUES-BRANDÃO, I.<sup>1\*</sup>; AMARANTE, L.<sup>2</sup>; PETERS, J.A.<sup>1</sup>; BRAGA, E.J.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Pelotas, RS, 960010-900, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Centro de Ciências Químicas e Farmacêuticas, Pelotas, RS, 960010-900, Brasil

**RESUMO:** Devido à importância medicinal e ecológica da espécie *Alternanthera tenella*, este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar as alterações no crescimento e fitoquímicas destas plantas quando cultivadas na presença do ácido salicílico no meio de cultura. Segmentos nodais foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações de ácido salicílico (0, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{M}$ ) onde permaneceram por 35 dias. Após este período, as plantas foram avaliadas quanto ao crescimento e ao teor de betacianinas e compostos fenólicos totais por métodos espectrofotométricos. Em relação às variáveis de crescimento analisadas, altura, comprimento da raiz, número de gemas, massa fresca da parte aérea e raiz, o elicitor mostrou-se visivelmente prejudicial, tendo resultado em uma diminuição das médias já na menor concentração utilizada (100  $\mu\text{M}$ ). Não houve diferença entre os tratamentos para o número de brotos. A concentração de 300  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico promoveu um aumento na produção de betacianina, como para compostos

fenólicos totais, chegando a 366% e 180%, respectivamente, em relação ao controle. Portanto o ácido salicílico se mostrou um inibidor do crescimento de plantas de *A.tenella in vitro*, porém estimulou a produção dos compostos de interesse deste estudo.

**Palavras-chave:** planta medicinal, apaga-fogo, cultura *in vitro*, elicitor

**ABSTRACT: Salicylic acid in vitro culture of *Alternanthera tenella* Colla and their capacity elicitor.** Due to medical and ecological importance of the specie *Alternanthera tenella*, this study was to investigate the changes in the growth and phytochemical characteristics of plant these plants when grown in the presence of salicylic acid in the culture medium. Nodal segments were inoculated on MS medium with different concentrations of salicylic acid (0, 100, 200, 300 and 400  $\mu\text{M}$ ) where they remained for 35 days. After this period, the plants were evaluated for growth and betacyanin content and total phenolics by spectrophotometric methods. In relation to growth variables, height, roots length, number of buds, fresh weight of shoot and root, the elicitor was shown to be clearly harmful, and resulted in a decreased the mean has the lowest concentration used (100  $\mu\text{M}$ ). The was no difference between treatments for the number of shoots. The concentration of 300  $\mu\text{M}$  of salicylic acid promoted an increase in the production of betacyanin, as for total phenolic compounds, reaching 366% and 180% respectively, in relation to control. Salicylic acid proved a growth inhibitory of plants of *A.tenella in vitro*, but stimulated the production of the compounds of interest of this study.

**Key Words:** medicinal plant, “apaga-fogo”, *in vitro* culture, elicitor

## INTRODUÇÃO

*Alternanthera tenella* Colla é uma planta herbácea, comumente conhecida como “apaga-fogo” ou “perpétua do mato”, sendo uma planta daninha potencialmente vulnerável a extinção (Decreto nº 42.099), é utilizada na medicina popular como anti-inflamatória e antibacteriana (Rego, 1995; Silveira & Olea, 2009). A infusão de suas folhas é utilizada em casos de infecções, febres, machucados, coceiras e também como diurética (Siqueira & Guimarães, 1984; Rego, 1995; Salvador et al., 2004). Seu uso tópico é descrito para picadas de insetos e inchaço (Souza et al., 1998).

Estudos fitoquímicos de plantas de *Alternanthera* indicaram a presença de compostos fenólicos, betalainas e cromoalcalóides (Brochado et al., 2003; Salvador & Dias, 2004; Salvador et al., 2006).

As betacianinas são pigmentos naturais N-heterocíclicos solúveis em água, que aparentemente substituem as antocianinas nas famílias da ordem Caryophyllales (Strack et al., 2003). Possuem coloração arroxeadada, sendo classificadas quimicamente em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina (Volp et al., 2009). O interesse por esses pigmentos cresceu desde que sua atividade anti-radical foi caracterizada, e passou a ser amplamente utilizada como aditivo para produtos alimentícios, fármacos e cosméticos devido as suas propriedades colorantes naturais e ausência de toxicidade (Dornenburg & Knorr, 1996).

Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis ou fenilpropanoides, é um grupo estruturalmente diverso de metabólitos secundários que inclui os metabólitos originados da condensação de unidades acetato, flavonoides, isoflavonoides e taninos (Bennett & Wallsgrove, 1994). Muitas pesquisas têm demonstrado que compostos fenólicos oriundos de plantas, possuem grande potencial antioxidante (Sousa et al., 2007), por capturarem diretamente espécies reativas ou os intermediários reativos de uma série de reações junto com as enzimas antioxidantes (Andrade et al., 2007).

A cultura *in vitro* vem sendo utilizada para a produção de compostos de interesse para as indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (Shim et al., 2010). Mesmo apresentando resultados satisfatórios, a produtividade desses compostos, como compostos fenólicos e nitrogenados, muitas vezes é menor em cultura de células se comparada a tecidos sintetizadores nas plantas e isso ocorre devido à falta de diferenciação das células em suspensão e em cultura de calo de tecidos e órgãos (Verpoorte et al., 2000; Bourgaud et al., 2001). Esta técnica permite o uso de elicitores (agentes químicos e estressantes), para alterar as rotas metabólicas afetando qualitativamente e quantitativamente as moléculas bioativas produzidas (Djilianov et al., 2005).

Elicitores abióticos como o ácido salicílico, quando aplicados exogenamente, podem desencadear sistemicamente a expressão de um conjunto de genes de defesa que naturalmente são ativadas quando ocorre infecção por patógeno (Kozlowski et al., 1999), estimulando a síntese de vários metabólitos vegetais (Atsushi et al., 2007), como os polifenóis e alcaloides (Van Loon, 1997).

Devido à importância medicinal e ecológica da espécie *A. tenella*, este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar as alterações no crescimento e fitoquímicas destas plantas quando cultivadas na presença do ácido salicílico no meio de cultura.

## **MATERIAL E MÉTODO**

Para a realização do experimento, foi utilizado meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 0, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico (AS). Os meios tiveram seu pH ajustado para 5,8 e após foi acrescido 7 g  $\text{L}^{-1}$  de agar. Aproximadamente 40 mL dos meios foram colocados em frascos e autoclavados por 20 minutos a uma temperatura de 121  $^{\circ}\text{C}$ , a pressão de 1,05  $\text{kg cm}^{-2}$ .

Segmentos nodais, contendo duas gemas axilares de plantas de *A. tenella*, pré-estabelecidas *in vitro*, foram utilizadas como fonte de explantes e inoculados nos meios de cultura em câmara de fluxo laminar em condições assépticas. Após, os frascos contendo quatro explantes foram colocados em sala de crescimento, onde permaneceram por 35 dias sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de  $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Decorridos 35 dias foi avaliado o número médio de gemas e brotos, altura (cm), massa fresca da parte aérea (g), comprimento da raiz principal, massa fresca das raízes (g) e quantificação de betacianina e fenóis totais da parte aérea das plantas.

Para quantificação de betacianina, foi utilizado 100 mg de massa fresca da parte aérea (folha e caule) a qual foi macerada em 5 mL de água milli-Q e centrifugada a 13632g, a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 25 minutos. A leitura da absorvância foi realizada no sobrenadante, nos comprimentos de onda de 536 nm e 650 nm, em espectrofotômetro, Ultrospec 2100 Pro da Amersham Biosciences®. A concentração de betacianina foi determinada levando em consideração o coeficiente de extração molar para amarantina ( $5,66 \times 10^4$ ) e o resultado foi expresso em mg amarantina  $100 \text{ g MF}^{-1}$  (Cai et al., 1998).

O teor de compostos fenólicos foi quantificado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, pela metodologia de Jennings (1981), com adaptações. Foi macerada 100 mg de massa fresca da parte aérea e adicionado 4 mL de M:C:W (metanol, clorofórmio e água milli-Q), na proporção de 12:5:3, e colocados em frascos de centrifuga, onde permaneceram no escuro por 24 h. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 min em temperatura ambiente a 7000 g, coletado o sobrenadante e o precipitado recentrifugado com mais 4 mL de M:C:W nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante novamente coletado. Os sobrenadantes foram misturados, adicionado de 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água milli-Q e centrifugados novamente. Deste sobrenadante foi

retirados 500  $\mu\text{L}$  e adicionado a ele 500  $\mu\text{L}$  de água milli-Q, 500  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu 1N e após 15 min de repouso foi adicionado 5 mL do reagente alcalino permanecendo em repouso por 60 min. Após esse período foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 760 nm, utilizando água milli-Q como branco. Foi utilizado ácido fênico como padrão para construção da curva analítica. Os resultados foram expressos em mg de ácido fênico  $\text{g MF}^{-1}$ .

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (concentrações de ácido salicílico), sendo cada um composto de três repetições, onde a unidade experimental foi representada por três frascos contendo quatro explantes, totalizando 45 frascos. Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial, com auxílio do software estatístico WinStat (Machado & Conceição, 2002).

## RESULTADOS

Aos 35 dias de cultivo *in vitro* observou-se que para as variáveis de crescimento analisadas, exceto número de brotos, o aumento da concentração de ácido salicílico foi inversamente proporcional aos valores médios encontrados (Figura 1 e 2).



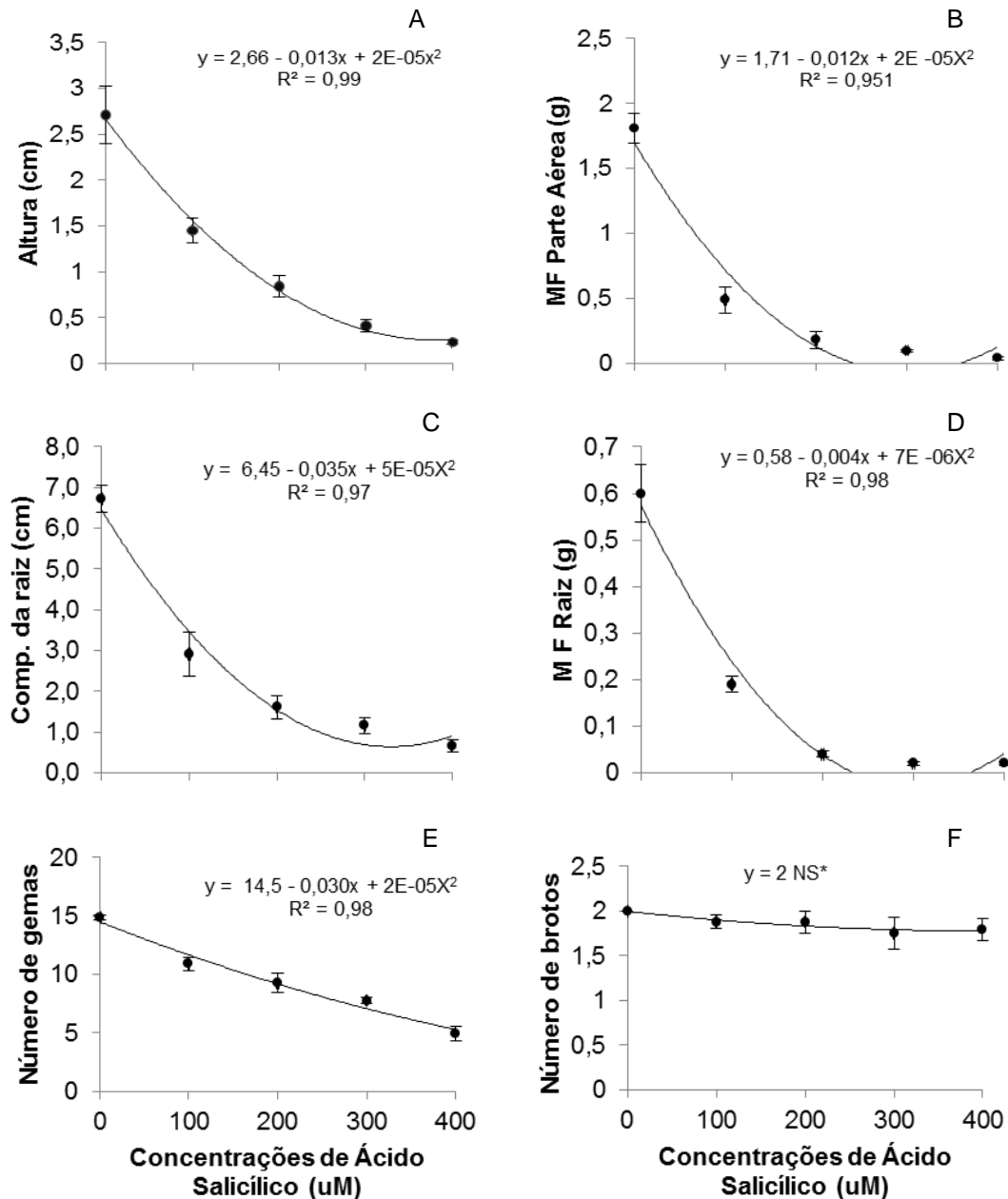
**FIGURA 1.** Plantas de *Alternanthera tenella* cultivadas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ácido salicílico por 35 dias. A barra indica 1 cm.

A altura média teve um decréscimo de 81% nas plantas tratadas com a maior concentração de ácido salicílico em relação ao controle (Figura 2A), gerando como consequência uma diminuição de 98% na massa fresca da parte aérea (Figura 2B).

O comprimento da raiz apresentou uma redução de 53% já na menor concentração de ácido salicílico em relação ao controle, chegando a 91% na concentração de 400  $\mu\text{M}$  (Figura 2C), com isso a massa fresca da raiz das plantas tratadas com o elicitor também obtiveram uma redução significativa, chegando a 97% (Figura 2D).

A presença de elicitor no meio de cultura também influenciou negativamente o número de gemas (Figura 2E), ocorrendo uma diminuição de 67% na maior concentração em relação ao controle.

O número de brotos não foi influenciado pela presença do ácido salicílico não havendo diferença significativa nos valores obtidos entre os tratamentos (Figura 2F), tendo sido observado uma média geral de 1,86 brotos/explante.

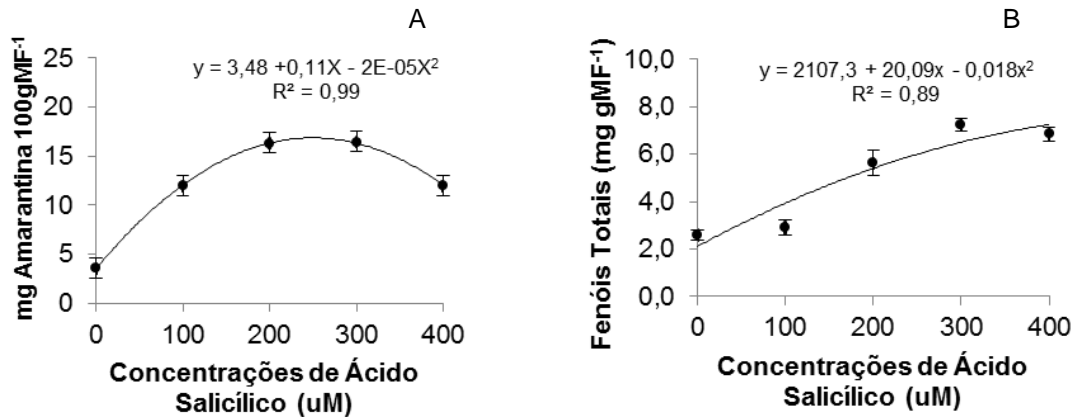


**FIGURA 2.** Altura (A), massa fresca (MF) da parte aérea (B), comprimento das raízes (C), massa fresca (MF) da raiz (D), número de gemas (E) e número de brotos (F), em plantas de *Alternanthera tenella* cultivadas *in vitro*, por 35 dias, em meio de cultura com diferentes concentrações de Ácido Salicílico.

\*As barras verticais representam o erro padrão da média de três repetições

Em relação às análises fitoquímicas a presença do elicitor no meio de cultivo apresentou aumento tanto para quantificação de betacianina, como para fenóis totais, sendo que para ambos a maior média foi observada nas plantas tratadas com a concentração de 300  $\mu\text{M}$  (Figura 3A e 3B, respectivamente).





**FIGURA 3.** Teor de betacianina (A) e de fenóis totais (B) em plantas de *Alternanthera tenella* cultivadas *in vitro*, por 35 dias, em meio de cultura com diferentes concentrações de Ácido Salicílico.

\*As barras verticais representam o erro padrão da média de três repetições

## DISCUSSÃO

O ácido salicílico é um hormônio vegetal que, quando aplicado exogenamente, pode inibir o crescimento da planta (Kerbaui, 2008), como foi observado nesse experimento, devido ao seu efeito antagônico às auxinas, o que reduz a concentração interna destas e conseqüentemente o alongamento celular.

Gutiérrez-Conrado et al. (1998) descreveram que diferentes concentrações de AS podem resultar em diminuição de 20% a 23% no crescimento de *Glycine max*, sendo que o efeito mais dramático foi observado nas raízes, as quais foram reduzidas em aproximadamente 45%.

A adição de ácido salicílico pode ter ocasionado um efeito tóxico, como já relatado em algumas espécies vegetais, estes resultados vem de encontro aos obtidos por vários outros autores (Tari et al., 2002; Shakirova et al., 2003; Arfan et al., 2007) que relataram que a aplicação exógena de ácido salicílico promove o crescimento de cultivares *in vitro*.

Coste et al. (2011) em trabalho com duas espécies de *Hypericum in vitro*, utilizando concentrações de 0, 100 e 200 µM de ácido salicílico e jasmônico, observaram que a biomassa da parte aérea das plantas tratadas não foi afetada com as concentrações

utilizadas, demonstrando com isso que a elicitação é um processo muito complexo e a resposta depende de muitos fatores tais como a concentração do elicitor, a fase de crescimento da cultura no momento da adição do elicitor e o tempo de contato da cultura com o elicitor. Além disso, a resposta a um determinado agente elicitor pode variar de espécie para espécie e é crucial determinar as concentrações adequadas para otimizar a produção dos metabólitos de interesse (Namedo, 2007).

O tratamento de plantas com elicitores abióticos é muito utilizado como estratégia para a produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos, sendo esta produção relacionada à indução de genes responsáveis pela resposta de defesa, ativando a via dos metabólitos secundários (Qian et al., 2006). Portanto o ácido salicílico apresenta efeito sobre a produção de compostos do metabolismo secundário, uma vez que este elicitor opera em vias de sinalização nas plantas, e respondem a estresses bióticos e abióticos (Namedo, 2007).

Estes resultados sugerem que o ácido salicílico aumenta a produção de compostos fenólicos, pois conforme Yu et al. (2006), esse aumento vem acompanhado pela indução de enzimas relacionadas a síntese de fenilpropanoides e regulação da expressão de genes relacionados a defesa das plantas. No entanto, altas concentrações de ácido salicílico acabam apresentando um efeito tóxico para a produção dos compostos fenólicos, como observado neste trabalho na concentração de 400  $\mu\text{M}$ . Kovacik et al. (2009) utilizaram a concentração de 250  $\mu\text{M}$  e observaram esse efeito tóxico, atribuindo ao aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase.

Apesar de o ácido salicílico induzir a síntese destes compostos do metabolismo secundário, os teores de betacianinas apresentados neste trabalho foram relativamente baixos, em comparação a dados de outras espécies do mesmo gênero, citadas na literatura, como Perotti et al. (2009), que em trabalho com *A. philoxeroides* elicitadas com

sulfato de cobre obtiveram valores próximos a 40 mg amaranquina 100 g MF<sup>-1</sup>. Assim como aos compostos fenólicos, que foram relativamente baixos, em comparação com os apresentados em trabalho realizado com cinco espécies de plantas medicinais, *Terminalia brasiliensis* Camb., *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc., *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire, *Qualea grandiflora* Mart. e *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore. (Sousa et al., 2007).

A partir dos dados obtidos pode-se concluir que as concentrações utilizadas de ácido salicílico apresentam efeito negativo para os parâmetros de crescimento analisados, porém na quantificação dos compostos secundários de interesse a elicitação das plantas se mostra favorável, aumentando de forma significativa as betacianinas e os compostos fenólicos totais.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C.A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn ex. Don Leguminosae-Mimosoidae. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, p.231-235, 2007.
- ARFAN, M.; ATHAR, H.R.; ASHRAF, M. Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? **Journal of Plant Physiology**, v.164, p. 685-694, 2007.
- ATSUSHI, O. et al. Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. **Plant Molecular Biology**, v.65, n.2, p.177-187, 2007.
- BENNET, R.N.; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v.127, n.4, p.617-633, 1994.
- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, n.5, p.839-851, 2001.
- BROCHADO, C.O. et al. Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliensis* (Amaranthaceae) and their Effects on Lymphocyte Proliferation *in vitro*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.14, n.3, p.449-451, 2003.

CAI, Y. et al. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.6, p.2063-2070, 1998.

COSTE, A. et al. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.106, p.279-288, 2011.

DECRETO n.º 42.099, de 31 de dezembro de 2002. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. **Palácio Piratini**, Porto Alegre, 2002.

DJILIANOV, D. et al. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlearthodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.80, p.115-118, 2005.

DORNENBURG, H.; KNORR, D. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Science**, v.15, p.141-168, 1996.

GUTIÉRREZ-CONRADO, M.A.; TREJO-LOPES, C.; LARQUE-SAVEDRA, A. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. **Plant Physiology Biochemistry**, v.36, n.8, p.563-565, 1998.

JENNINGS, A.C. The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v.118, p. 396-398, 1981.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Guanabara: Koogan, 2008. 452 p.

KOVACIK, J. et al. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. **Plant Cell Reports**, v.28, p.135-143, 2009.

KOZLOWSKI, G.; BUCHALA, A.; METRAUX, J. Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst] seedlings against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.53-58, 1999.

MACHADO, A.; CONCEIÇÃO, A. R. Programa estatístico WinStat **Sistema de Análise Estatístico para Windows**. Versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2002.

MORAES, V.J.G et al. Inhibition of lymphocyte activation by extracts and fractions of *Kalanchoe*, *Alternanthera*, *Paullinia* and *Mikania* species. **Phytomedicine**, v.1, p.199-204, 1994.

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

NAMEDO, A.G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. **Pharmacognosy Reviews**, v.1, p.69-79, 2007.

PEROTTI, J.C. et al. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, v.40, p.1874-1880, 2010.

QIAN, Z.G. et al. Novel chemically synthesized salicylate derivative as an effective elicitor for inducing the biosynthesis of plant secondary metabolites. **Biotechnology Progress**, v.22, p.331–333, 2006.

REGO, T.J.A. **Fitogeografia das Plantas Medicinais no Maranhão**, 2.ed. São Luís: EDUFMA, 1995, 133p.

SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima*(Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.107-110, 2004.

SALVADOR, M.J. et al. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift fur Naturforsch**, v.61c, p.19-25, 2006.

SHAKIROVA, F.M., et al. Changes in hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. **Plant Science**, v.164, p.317-322, 2003.

SHIM, K.M. et al. Accumulation of cell biomass anthraquinones, phenolics, and flavonoids as affected by auxin, cytokinin, and medium salt strength in cell suspension culture of *Morinda citrifolia*. **Korean Journal of Horticultural Science & Technology**, v.28, n.2, p.288-294, 2010.

SILVEIRA, L.M. da S., OLEA, R.S.G. Isolamento de compostos com atividade antibacteriana em *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.90, n.2, p.148-153, 2009.

SIQUEIRA, J.C.; GUIMARÃES, E.F. Amaranthaceae no Rio de Janeiro – espécie *Alternanthera forsskal*. **Rodriguésia**, v.36, p.21-40, 1984.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v.62, p.247-269, 2003.

SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, p.351- 355, 2007.

SOUZA, M.M. et al. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytotherapy Research**, v.12, n.4, p.279-281, 1998.

TARI, I.J. et al. Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. **Acta Biologica Szegediensis**, v.46, p.55-56, 2002.

VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.

VERPOORTE, R.A. et al. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v.9, n.4-5, p.323-343, 2000.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v.20, p.157-166, 2009.

YU, Z.Z. et al. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. **Biotechnology Letters**, v.28, p.1027-1031, 2006.

## ARTIGO 2: ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM

### Metabolismo secundário de *Alternanthera tenella* Colla elicitada com ácido salicílico

Isabel Rodrigues Brandão<sup>1\*</sup>; Luciano do Amarante<sup>2</sup>; José Antonio Peters<sup>1</sup>; Eugenia Jacira Bolacel  
Braga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Pelotas, RS, 960010-900, Brasil

\*brandao.brandona@hotmail.com, (53) 3279-7316

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Centro de Ciências Químicas e Farmacêuticas, Pelotas, RS, 960010-900, Brasil

**Resumo** Este trabalho objetivou avaliar a influência do ácido salicílico na produção de metabólitos secundários e na atividade antioxidante em plantas de *Alternanthera tenella* cultivadas *in vitro*, visto este ser considerado um elicitor abiótico. As plantas de *A. tenella* cresceram no substrato vermiculita acrescido de meio MS líquido e após 35 dias foi adicionada a concentração de 400 µM de ácido salicílico, permanecendo por 0, 12, 36 e 48-h. Após cada período foram quantificadas as betacianinas, fenóis totais e flavonoides totais bem como a capacidade antioxidante de forma não-enzimática pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), das folhas das plantas submetidas aos tratamentos. Para teor de betacianina e fenóis totais o tempo de 36-h ocasionou um aumento de 296% e 60%, respectivamente. Para flavonoides totais o aumento do tempo de exposição ao ácido salicílico promoveu uma pequena queda no teor destes compostos, possivelmente devido ao aumento da síntese das betacianinas promovidas pelo elicitor. A porcentagem de inibição do radical livre DPPH foi aumentada nas maiores horas de exposição ao ácido salicílico. Com base nos resultados encontrados conclui-se que o ácido salicílico é um indutor da síntese de betacianinas e compostos fenólicos, porém diminui a síntese de flavonoides. A atividade antioxidante destas plantas pode ser atribuída ao aumento das betacianina que apresentam comprovada ação antioxidante.

**Palavras-chave** planta medicinal, apaga-fogo, DPPH, flavonoides, compostos fenólicos, betacianina.

**Abstract** This study evaluated the influence of salicylic acid in the production of secondary metabolites and antioxidant activity in plants of *Alternanthera tenella* cultured *in vitro*, since this is considered an abiotic elicitor. Plants of *A. tenella* grew in the substrate vermiculite plus MS liquid medium and after 35 days were added to concentration of 400

$\mu\text{M}$  of salicylic acid, remaining by 0, 12, 36 and 48-h. After this period were quantified betacyanins, total phenols and total flavonoids and antioxidant capacity observed in a non-enzymatic method DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), the leaves of plants subjected to treatments. To content of betacyanin and total phenols the time of 36-h showed a higher increase in the concentration, causing an increase of 296% and 60%, respectively. To total flavonoids, the increase of time of exposure to salicylic acid promoted a small decrease in content of these compounds, possibly due to increased synthesis of betacyanins promoted by elicitor. The inhibition percentage free radical DPPH was increased in the largest hours of exposure to salicylic acid. Based on the results found it is concluded that salicylic acid is an inducer of synthesis of betacyanins and phenolic compounds, however decreases the synthesis of flavonoids. The antioxidant activity of these plants can be attributed to the increase of betacyanin that have proven antioxidant.

**Keywords** medicinal plant, “apaga-fogo”, DPPH, flavonoids, phenolic compounds, betacyanin.

## **Introdução**

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (Atoui et al. 2005).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podendo ser reciclados por outro antioxidante (Valko et al. 2004, Atoui et al. 2005).

Neste contexto, muitas pesquisas têm demonstrado que compostos fenólicos oriundos de plantas, possuem grande potencial antioxidante (Sousa et al. 2007), por capturarem diretamente espécies reativas ou os intermediários reativos de uma série de reações junto com as enzimas antioxidantes (Andrade et al. 2007). Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (Soares 2002). A atividade dos compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e pela estrutura química. Estas características desempenham papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição,



agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Soares 2002, Chun et al. 2005).

Compostos como as betacianinas também tem merecido destaque, sendo que o interesse por esses pigmentos cresceu desde que sua atividade anti-radical foi caracterizada, passando a ser amplamente utilizada como aditivo para produtos alimentícios, fármacos e cosméticos devido as suas propriedades colorantes naturais e ausência de toxicidade (Strack et al. 2003).

Plantas do gênero *Alternanthera* possuem compostos biologicamente ativos conhecidos, entre eles betalaínas (betacianinas e betaxantinas), ecdisteroides, flavonoides, saponinas e triterpenos (Ferreira e Dias 2000). Dentre as espécies deste gênero, destaca-se a *Alternanthera tenella* Colla, uma planta herbácea, comumente conhecida como “apaga-fogo” (Ferreira et al. 2003) ou “perpétua do mato” (Guerra et al. 2003), frequentemente encontrada em todo território brasileiro. Na medicina popular é utilizada por via oral, na forma de infusão, no tratamento de inflamações e infecções (Rego 1995, Biella et al. 2008), apresentando atividades biológicas como antibacteriana (Salvador 2005) e antifúngica (Salvador et al. 2003). Salvador et al. (2006) comprovaram ação antioxidante de extrato etanólico desta planta, isolando seis diferentes flavonoides.

Moléculas como o ácido salicílico estão envolvidas na sinalização de sistemas que induzem enzimas que catalisam reações de biossíntese para formação de compostos de defesa como os polifenóis e alcaloides (Van Loon 1997). Essas moléculas, quando aplicadas exogenamente podem desencadear sistemicamente a expressão de um conjunto de genes de defesa que naturalmente são ativadas quando ocorre infecção por patógeno (Kozłowski et al. 1999), estimulando a síntese de vários metabólitos vegetais (Atsushi et al. 2007).

Visto que o ácido salicílico é um elicitador abiótico, este trabalho objetivou avaliar a sua influência na produção de metabólitos secundários bem como a capacidade antioxidante de plantas de *Alternanthera tenella* cultivadas *in vitro*.

## **Material e Métodos**

### **Material vegetal e tratamento com ácido salicílico**

Para a condução desse experimento foram utilizados frascos contendo vermiculita como substrato, acrescido de meio MS (Murashige e Skoog 1962) líquido, que foram autoclavados por 20 minutos a uma temperatura de 121°C, a pressão de 1,05 kg cm<sup>-2</sup>. Segmentos nodais de plantas de *Alternanthera tenella* Colla com aproximadamente 1 cm de

comprimento, contendo duas gemas, foram utilizados como explantes e inoculados no substrato em câmara de fluxo laminar em condições assépticas e permaneceram em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de  $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Após 35 dias foi adicionado aos frascos, sobre o substrato vermiculita, 15 mL de ácido salicílico na concentração de  $400 \mu\text{M}$ , permanecendo por 0, 12, 36 e 48 horas. Ao final de cada período, folhas foram coletadas e armazenadas em ultrafreezer ( $-70^\circ\text{C}$ ) para posterior realização das análises de betacianina, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante.

### **Quantificação de betacianina**

Para quantificação de betacianina, 100 mg de folhas frescas foram maceradas com celite em 5 mL de água destilada e após, centrifugada a  $13632 \text{ g}$ , a  $4^\circ\text{C}$  por 25 minutos. A quantificação das betacianinas foi realizada no sobrenadante, através da leitura da absorbância, nos comprimentos de onda de 536 nm e 650 nm, em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro da Amersham Biosciences®, conforme metodologia descrita por Cai et al. (1998). A concentração de betacianina foi calculada e expressa levando em consideração o coeficiente de extração molar para amarantina ( $5,66 \times 10^4$ ) e o resultado foi expresso em mg amarantina  $100 \text{ g MF}^{-1}$ .

### **Quantificação de compostos fenólicos totais**

O teor de compostos fenólicos foi quantificado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, pela metodologia de Jennings (1981), com adaptações. Foram macerados 100 mg de massa fresca de folha, adicionado 4 mL de M:C:W (metanol, clorofórmio e água, na proporção de 12:5:3) e colocados em frascos de centrífuga, onde permaneceram no escuro por 24-h. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 min em temperatura ambiente a  $7000 \text{ g}$ , coletado o sobrenadante e o precipitado recentrifugado com mais 4 mL de M:C:W nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante novamente coletado. Os sobrenadantes foram misturados, adicionados de 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água e centrifugadas novamente. Em  $500 \mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado  $500 \mu\text{L}$  de água milli-Q,  $500 \mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu 1N e após 15 min, 5 mL do reagente alcalino, permanecendo em repouso por 60 min. Após esse período foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 760 nm, utilizando água como branco. O ácido fênico foi utilizado como padrão para construção da curva analítica. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de ácido fênico  $\text{g MF}^{-1}$ .

### **Quantificação de flavonoides totais**

A concentração de flavonoides totais foi determinada por meio do método colorimétrico descrito por Zou et al. (2004). O procedimento baseia-se na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio e os flavonoides em meio metanólico. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 5% (m/v) em metanol (Wu e Ng 2008). Para a análise foi utilizado extrato metanólico ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), preparado a partir de 250 mg de massa seca de folhas de *A. tenella* que permaneceram em 10 mL de metanol 70% por 24-h.

### **Atividade antioxidante pelo método DPPH**

A atividade antioxidante foi analisada a partir do método DPPH (Brand-Williams et al. 1995), que é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm. Foi preparada solução metanólica de DPPH  $60\mu\text{M}$ , de forma a apresentar absorvância em 515 nm entre 0,6 e 0,7. As determinações foram realizadas adicionando-se 3,9 mL da solução de DPPH e 0,1 mL dos extratos metanólicos, em estudo, a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em tubos de ensaio. Para avaliação da atividade captadora de radical livre foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH, calculados em relação à amostra controle (metanol+ DPPH  $60\mu\text{M}$ ), pela equação: % inibição do DPPH =  $[(A_0 - A_1) / A_0 \times 100]$ , onde:  $A_0$  = absorvância do controle;  $A_1$  = absorvância da amostra (Molyneux 2004).

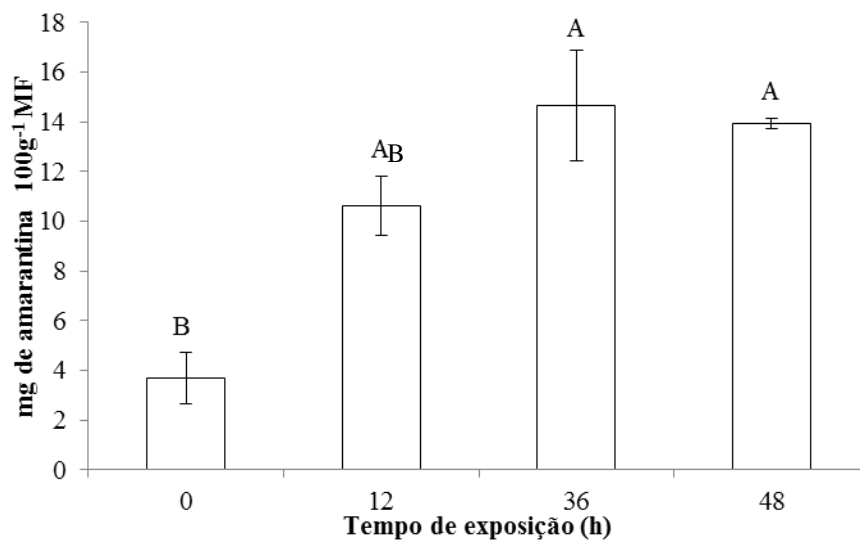
### **Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, compostos de quatro tratamentos (horas de exposição ao ácido salicílico), com três repetições, sendo cada unidade experimental representada por cinco frascos contendo quatro explantes. Os resultados foram, submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico WinStat (Machado e Conceição 2002).

## Resultados

### Quantificação de betacianina

Plantas mantidas a 400  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico, independente do tempo de exposição apresentaram maior teor de betacianina quando comparada ao controle (Figura 1).

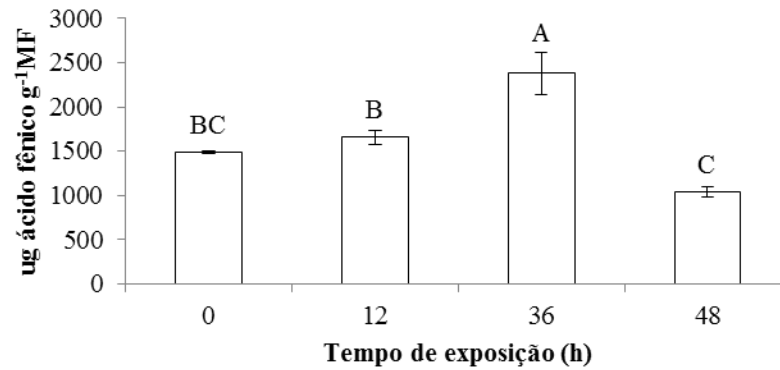


**Fig. 1** Produção de betacianina em plantas de *Alternanthera tenella*, submetidas a diferentes tempos de exposição ao ácido salicílico. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*As barras verticais representam o erro padrão da média de três repetições

### Quantificação de compostos fenólicos

Verificou-se diferença significativa entre os tratamentos em relação ao teor de compostos fenólicos, sendo a maior média obtida nas plantas expostas a 36-h (2378,2  $\mu\text{g}$  ácido fênico  $\text{g MF}^{-1}$ ). O tempo de 12-h não diferiu do controle, ficando em torno de 1657,0 e 1485,1  $\mu\text{g}$  ácido fênico  $\text{g MF}^{-1}$ , respectivamente. Nas 48-h de exposição as plantas apresentaram valores mais baixos que os encontrados no controle, chegando a 1039,8  $\mu\text{g}$  de ácido fênico  $\text{g MF}^{-1}$ , porém não diferiu estatisticamente do controle (Figura 2).

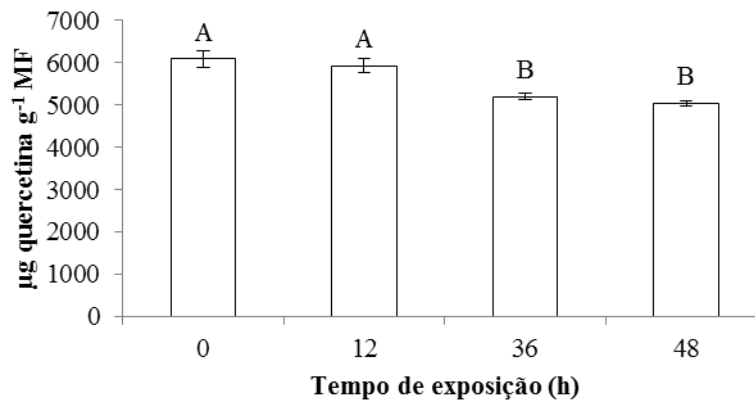


**Fig. 2** Teor de compostos fenólicos totais em plantas de *Alternanthera tenella*, submetidas a diferentes tempos de exposição ao ácido salicílico. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*As barras verticais representam o erro padrão da média de três repetições

### Quantificação de flavonoides totais

O aumento do tempo de elicitação causou um decréscimo na síntese de flavonoides totais, sendo as maiores médias observadas nos extratos das plantas controle e após 12-h de exposição ao elicitor, ocorrendo um decréscimo significativo de 18% no último tempo de elicitação em relação ao controle (Figura 3).

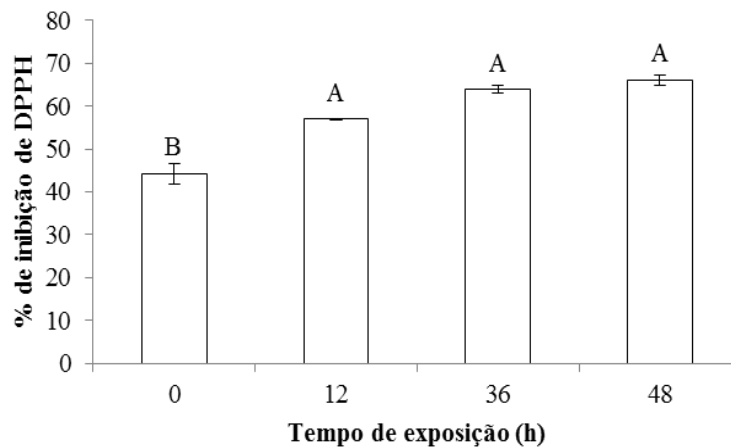


**Fig. 3** Teor de flavonoides totais em plantas de *Alternanthera tenella*, submetidas a diferentes tempos de exposição ao ácido salicílico. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*As barras verticais representam o erro padrão da média de três repetições

### Atividade antioxidante

Através da análise da atividade antioxidante pelo método DPPH, pode-se observar que a exposição ao elicitor abiótico influencia de forma significativa no potencial antioxidante do extrato, não tendo sido observada diferença estatística entre os tempos de exposição, apesar do controle já apresentar uma boa atividade antioxidante (45%).



**Fig. 4** Porcentagem de inibição do DPPH de extratos metanólicos de plantas submetidas a diferentes tempos de exposição ao ácido salicílico. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*As barras verticais representam o erro padrão da média de três repetições

### Discussão

O ácido salicílico tem sido amplamente estudado em relação aos mecanismos de sinalização em plantas e as respostas ao ataque de pragas e doenças (Hammerschmidt 1999, Pozo et al. 2004; Fujita et al. 2006) o que provavelmente está relacionado à capacidade de afetarem o metabolismo secundário de plantas (Nugroho et al. 2002; Avancini et al. 2003; Boonsongcheep et al. 2010; Korsangruang et al. 2010).

Em trabalho realizado com diferentes tipos de elicitor em diferentes tempos, o ácido salicílico se mostrou o mais eficiente na síntese de compostos fenólicos em *Solanum melongena* L. no tempo de 48-h, ocorrendo um decréscimo gradual da síntese destes compostos (Mandal 2010) em maiores tempos. No presente estudo observou-se uma queda no teor de compostos fenólicos em 48-h de exposição ao elicitor, após ter o máximo de síntese nas 36-h de elicitação.

Yu et al. (2006) obtiveram um aumento gradual de flavonoides totais ao longo do tempo, chegando a 96% em 48-h de tratamento em relação ao controle, porém a concentração do elicitor foi mais baixa do que a utilizada neste trabalho. Em estudos com *Malus domestica*, Houhua et al. (2007), obtiveram aumentos significativos na síntese de

fenilpropanoides quando as plantas foram tratadas com ácido salicílico. Estes resultados sugerem que o ácido salicílico induz o acúmulo de compostos derivados dos fenilpropanoides, devido ao aumento da atividade da enzima FAL (fenilalanina amônia liase), entre outras enzimas, desempenhando um papel importante no processo de transdução que estimula a síntese destes compostos e regula a expressão de genes de defesa (Yu et al. 2006).

Entretanto para *A. tenella*, o aumento do tempo de exposição ao elicitor foi desfavorável para o aumento de flavonoides e benéfico para a formação de betacianina, podendo ter ocorrido uma rota preferencial para este composto, a partir da tirosina, precursor comum entre ambos.

Nas plantas da ordem Caryophyllales, como a espécie em estudo, alguns flavonoides como as antocianinas, podem ser substituídos pelas betalainas, e a sua biogênese começaria a partir da hidroxilação do aminoácido tirosina pela enzima tirosinase ou polifenoloxidase (PFO), formando um intermediário, a DOPA (4,5 dihidroxifenilalanina), que por sua vez, sofre oxidação, transformando-se em ciclo dihidroxifenilalanina, que por reações espontâneas, ou ainda desconhecidas, originam a classe das betalainas (Grandía–Herrero et al. 2005, Tanaka et al. 2008).

Os resultados encontrados sugerem que plantas de *Alternanthera* apresentam a substituição dos flavonoides pelas betacianinas e que estes compostos apresentam confirmada atividade antioxidante (como demonstrado neste estudo). Apesar de terem apresentados valores significativamente mais baixos do que os encontrados, com a mesma espécie, por Kleinowski (2011), que obteve um valor de 36,95 mg de amarantina 100 g MF<sup>-1</sup> com elicitação de 75 µM de tirosina, isto pode ser explicado pelo tipo de material vegetal e elicitor utilizado nas análises. No trabalho citado foi utilizado parte aérea (folhas e caule) para a quantificação, indicando que as betacianinas podem ser preferencialmente armazenadas no caule.

O ensaio envolvendo a captação do radical DPPH tem sido uma ferramenta muito utilizada para triagem de substâncias com potencial antioxidante. A capacidade detoxificadora para radicais DPPH, exercida por compostos fenólicos já está descrita na literatura (Acker et al. 1996; Heim et al. 2002). O trabalho publicado por Tang et al. (2004), pesquisaram extratos de 33 plantas medicinais chinesas, contendo compostos fenólicos, e todos apresentaram efeito detoxificador para o radical DPPH. Trabalho semelhante foi realizado por Leung e Shui (2002), sendo analisada a atividade antioxidante de 27 espécies vegetais encontradas nos mercados públicos da cidade, também tendo sido caracterizada a atividade antioxidante de extratos ricos em compostos fenólicos pelo método do DPPH.

O aumento da atividade antioxidante observado neste trabalho está relacionado com o aumento da síntese de betacianina, visto que este composto demonstra altos níveis de atividade antioxidante, como já relatado em estudos com beterraba (Stintzing e Carle 2004), sendo comprovado que estes compostos estão entre os dez mais potentes antioxidantes, característica esta atribuída à conformação estrutural. Outros estudos demonstraram a atuação das

betacianinas também na prevenção de alguns tipos de câncer, dentre eles, o de pele e fígado, devido suas propriedades antioxidantes (Lila 2004).

## Conclusões

A adição de ácido salicílico ao meio de cultivo de plantas de *A. tenella* aumenta os teores de betacianina e compostos fenólicos, porém reduz a concentração de flavonoides totais. Este elicitor também se mostra favorável ao aumento da atividade antioxidante das folhas de plantas de *A. tenella* nas condições estudadas.

## Referências

- Acker SABE, Berg DJVD, Tromp MNJL, Griffioen DH, Bennekom WPV, Vijgh WJFVD, Bast A (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonóides. *Free Rad Biol Med.* 20: 331-342
- Andrade CA, Costa CK, Bora K, Miguel MD, Miguel OG, Kerber VAD (2007) Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn ex. Don Leguminosae-Mimosoidae. *Rev Bras Farm.* 17: 231-235
- Atoui AK., Mansouri, A, Boskou G, Kefalas P (2005) Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* 89: 27-36
- Atsushi O, Takafumi S, Kazumari OTK, Jinichiro KNSHN, Hisakazu Y (2007) Elicitor induced activation of the methyerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. ***Plant Mol Biol.*** 65:177-187
- Avancini G, Abreu IN, Saldaña MDA, Mohamed RS, Mazzafera P (2003) Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyl jasmonate. *Phytoch.* 63: 171-175
- Biella CA, Salvador MJ, Dias DA, Dias-Baruffi M, Pereira-Crott LS (2008) Evaluation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects and phytochemical screening of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aqueous extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 569-577
- Boonsongcheep P, Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathanurug S (2010) Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:119–126
- Brand-Wiliams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci and Tech* 28: 25-30
- Cai Y, Sun M, Wu H, Huang R, Corke H (1998) Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *J Agric Food Chem.* 46: 2063-2070
- Chun SS, Vatem DA, Lin YT, Shetty K (2005) Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.* 40: 809-816
- Ferreira EA, Procópio SO, Silva EAM, Silva AA, Rufino RJN (2003) Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV - *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha* 21: 263- 271



- Ferreira EO, Dias DA (2000) A methyllene dioxy flavonol from aerial parts of *Blutaparon portulacoides*. *Phytochem.* 53: 145-147
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Cur Opin Plant Biol.* 9: 436-442
- Grandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F (2005) Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *Planta* 222: 586-593
- Guerra RNM, Pereira HAW, Silveira LMS, Olea RSG (2003) Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice. *Braz J Med Biol Res.* 36: 1215-1219
- Hammerschmidt R (1999) Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiol Mol Plant Pathol.* 55: 77-84
- Heim K E, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J Nutrit Bioch.* 13:572-584
- Houhua L, Henryk K., Thilo CF, Magda VH, Gert F, Dieter TWS, Thomas H, Iris S (2007) Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins, and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Bords). *Planta* 226: 1243-1254
- Jennings A C (1981) The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. *Anal Biochem.* 118: 396-398
- Kleinowski AM (2011) Produção de betacianina, crescimento e potencial bioativo de plantas do gênero *Alternanthera*. Dissertação, Universidade Federal de Pelotas
- Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathanturug S (2010) Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *P. candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 103:333–342
- Kozłowski G, Buchala A, Metraux J (1999) Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst] seedlings against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 55: 53-58
- Leung LP, Shui G (2002) An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 76: 69-75
- Lila MA (2004) Plant pigments and human health. In: Davis S (ed) *Plant pigments and their manipulation*, 3rd edn. Oxford, pp 248-274
- Machado A, Conceição AR (2002) Programa estatístico WinStat Sistema de Análise Estatístico para Windows. Versão 2.0. Pelotas: UFPel
- Mandal S (2010) Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *African J of Biotech.* 9: 8038-8047
- Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol* 26: 211-219
- Murashige T, Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phys Plant.* 15: 473-97
- Nugroho LH, Verberne MC, Verpoorte R (2002) Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. *Plant Physiol Bioch.* 40: 755-760
- Pozo M.J, Loon LCV, Pieterse CMJ (2004) Signals in plant-microbe interactions. *J Plant Growth Reg.* 23:211-222
- Rego TJA (1995) *Fitogeografia das Plantas Medicinais no Maranhão*. São Luís, Maranhão

- Salvador MJ (2005). Estudo químico, biológico e biotecnológico de *Alternanthera maritima* e *Alternanthera tenella* (Gomphreneae, Amaranthaceae). Tese, Universidade de São Paulo
- Salvador MJ, Ferreira EO, Mertens-Talcott SU, Castro WV, Butterweck V, Derendorf H, Dias DA (2006) Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Z Naturforsch* 61: 19-25
- Salvador MJ, Ferreira JC, Zul LMC, Bolzani VS, Dias DA, Candido RC (2003) Antifungal susceptibility tests of crude extracts from *Alternanthera maritima*, *A. tenella* Colla and *Calycophyllum spruceanum* Benth against four *Candida ssp* determined by agar-well diffusion and Broth macrodilution methods. *Braz J Pharm Sci* 39: 240
- Soares SE (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr.* 15: 71-81
- Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, da Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH (2007) Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova* 30: 351-355
- Stintzing FC, Carle R (2004) Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 5: 19-38
- Strack D, Vogt T, Schliemann W (2003) Recent advances in betalain research. *Phytochem.* 62:247-269
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54:733-49
- Tang SY, Whiteman M, Peng ZF, Jenner A, Yong EL, Halliwell B (2004) Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional Chinese medicines. *Free Radic Biol Med.* 15: 1575-1587
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol and Cell Biochem.* 266: 37-56
- Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur Plant Pathol.* 103:753-765
- Wu SJ, Ng LT (2008) Antioxidante and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviate* Ser.) in Taiwan. *LWT* 41: 323-330
- Zou YP, Lu YH, Wei DZ (2004) Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *J Agric Food Chem.* 52: 5032-5039
- Yu ZZ, Fu CX, Han YS, Li YX, Zhao DX (2006) Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. *Biotech Lett.* 28:1027-1031