METIL JASMONATO AUMENTA O CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS DE Stevia rebaudiana BERTONI (ASTERACEAE)

Simone Ribeiro Lucho [1]

Cristini Milech [2]

Marcelo Nogueira do Amaral [3]

Eugenia Jacira Bolacel Braga [4]

Alitcia Moraes Kleinowski [5]

Antonio Asensio Calderón [6]

Valmor João Bianchi [7]

Resumo:

A espécie Stevia rebaudiana é uma planta medicinal cultivada em todo o mundo. Os extratos de suas folhas podem ser utilizados como fonte não apenas de adoçantes não calóricos, mas também de compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos. As vias biossintéticas destes metabólitos são marcadamente influenciadas por elicitores, que são moléculas que desencadeiam alterações nos fluxos metabólicos e na fisiologia da planta em estudo. A elicitação abriu uma nova área de pesquisa que poderá ter benefícios importantes para espécies com potencial terapêutico conhecido, como é o caso da estevia. Entretanto, são necessários estudos para determinar a concentração e tempo necessário de exposição ao agente elicitor para aumentar a produção de compostos bioativos. Diante disso, o presente trabalho foi realizado para avaliar a capacidade elicitora do metil jasmonato (MeJa) sobre o conteúdo de compostos fenólicos dos extratos etanólicos de folhas de Stevia rebaudiana após 24, 48 e 96 horas de elicitação. Para atender este objetivo as plantas de estevia foram inicialmente cultivadas in vitro e posteriormente passaram para um sistema hidropônico de fluxo contínuo com raízes flutuantes. Os tratamentos foram compostos pelo controle - somente com solução de Hoagland (50%) - e o tratamento com elicitor - solução de Hogland com 100 M de MeJa. Após 24 h da aplicação dos tratamentos, as folhas destas plantas foram coletadas em um período de quatro dias com intervalos de 24 horas. Para que as quantificações fossem realizadas, métodos espectrofotométricos foram aplicados. De um modo geral, observou-se que o maior tempo de exposição (96h) ao MeJa propiciou um aumento no conteúdo de fenólicos solúveis totais nos extratos das folhas de estevia. Estes resultados abrem novos caminhos a serem explorados, além de contribuir com resultados promissores em relação à otimização da produção dos compostos de interesse em Stevia rebaudiana.

Palavras-chave: ESTEVIA; ELICITORES, METABOLISMO SECUNDÁRIO

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

METIL JASMONATO AUMENTA O CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS DE Stevia rebaudiana BERTONI (ASTERACEAE)

[1] Aluno de pós-graduação. simonibelmonte@gmail.com. Autor principal

[2] Doutoranda no PPG em Fisiologia Vegetal-UFPel. crismilech.cm@gmail.com. Co-autor

[3] Doutorando no PPG em Fisiologia Vegetal-UFPel. theonamaral@gmail.com. Co-autor

[4] Docente. jacirabraga@hotmail.com. Orientador

[5] Pós-doutoranda no PPG em Fisiologia Vegetal-UFPel. akleinowski.ib@ufpel.edu.br. Co-orientador

[6] Docente na Universidad Politecnica de Cartagena-UPCT/Espanha. antonio.calderon@upct.es. Co-orientador

[7] Docente no PPG em Fisiologia Vegetal-UFPel. valmorjb@yahoo.com. Co-orientador

METIL JASMONATO AUMENTA O CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS DE *Stevia rebaudiana* BERTONI (ASTERACEAE)

1 INTRODUÇÃO

As principais consequências da produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células, são os danos aos ácidos nucléicos, lipídios e proteínas, que podem comprometer gravemente as funções celulares e ocasionar várias patologias humanas (VALKO et al., 2007). Algumas plantas medicinais produzem compostos fenólicos que atuam como antioxidantes, principalmente devido à sua estrutura química, que determina seu desempenho como agentes redutores, doadores de átomos de hidrogênio e interruptores de cadeias de radicais livres (SHUKLA et al., 2009).

Dentre estas plantas medicinais, a espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni, conhecida como estevia, produz além dos glicosídeos de esteviol (GSs) outros fitoquímicos que proporcionam atividades antioxidantes e potenciais benefícios à saúde (LEMUS-MONDACA et al., 2012), tais como: fenois, flavonoides, alcaloides, ácidos hidroxicinâmicos, vitaminas, fitoesteróis e óleos essenciais, entre outros (KARAKÖSE et al., 2011). Mas, para que o potencial medicinal desta espécie seja explorado de um modo sustentável, são necessárias estratégias biotecnológicas para a obtenção de biomassa e, neste sentido, o cultivo in vitro e o sistema hidropônico auxiliam no cultivo destas plantas e adicionalmente oferece uma abordagem alternativa para a padronização, otimização e produção dos seus compostos.

Contudo, as vias biossintéticas destes metabólitos secundários são marcadamente influenciadas por vários elicitores. Os elicitores são moléculas que desencadeiam alterações nos fluxos metabólicos e consequentemente afetam os parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares da planta em estudo (RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016; GIRI et al., 2016). Hormônios vegetais podem ser considerados elicitores, entre estes o metil jasmonato (MeJa), por agir eficientemente na produção de metabólitos secundários em diversas plantas medicinais (WANG et al., 2013). Entretanto, as concentrações utilizadas, a duração da exposição e o estádio de desenvolvimento no momento do tratamento são fatores importantes que influenciam no acúmulo dos metabólitos secundários. Diante disso o presente trabalho foi realizado para avaliar a capacidade elicitora do MeJa (100 μM) sobre o conteúdo de compostos fenólicos dos extratos etanólicos de folhas de *Stevia rebaudiana* após 24, 48 e 96 horas de elicitação.

2 METODOLOGIA

Material vegetal, condições experimentais e preparo dos extratos etanólicos

Plantas de *Stevia rebaudiana* foram estabelecidas in vitro, multiplicadas e aclimatizadas em casa de vegetação, usando bandejas plásticas (20 x 7 x 3 cm), contendo os substratos Plantmax® e vermiculita (1:1).

Após 30 dias, as plantas foram transferidas para um sistema hidropônico de fluxo contínuo com raízes flutuantes contendo solução de Hoagland (50%) (HOAGLAND; ARNON, 1950) por dois dias, para aclimatar as raízes ao sistema. Posteriormente as plantas foram submetidas aos tratamentos - sendo o controle a solução de Hoagland (50%) e o tratamento com elicitor a mesma solução, suplementada com 100 μM de metil jasmonato. Folhas dessas plantas foram coletadas durante um período de quatro dias em intervalos de 24, 48 e 96 horas. O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado em um fatorial 2 x 3, que correspondem a presença e ausência do agente elicitor (MeJa) e três períodos de exposição aos tratamentos. Para cada combinação, foram realizadas três repetições biológicas, das quais cada uma consistiu de um vaso com cinco plantas.

Após as coletas, as folhas foram armazenadas em nitrogênio líquido até o processo de liofilização. As amostras liofilizadas (150 mg) foram homogeneizadas usando um micropistilo e extraídas com 4 mL de etanol a 70%. A extração foi realizada utilizando um banho ultrassônico, onde as amostras foram mantidas por 30 min a uma temperatura de 80 °C. Posteriormente uma centrifugação foi realizada (15.000 × g_{max}, 4 °C por 5 min) e os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -20 °C até que as quantificações fossem realizadas.

Quantificação do teor de fenol solúvel total

O teor de fenol solúvel total foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu como descrito por López-Orenes et al. (2013) usando ácido gálico (0-3000 µM) como padrão. Foi misturados 190 µL de água MilliQ, 12,5 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 10 µL de extratos de estevia diluídos com etanol 70%, na concentração 1:10. Em seguida, foram adicionados 75 µL de Na_2CO_3 a 20% e os tubos de reação foram incubados durante 2,5 h no escuro. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de ácido gálico por grama de massa seca.

Quantificação do conteúdo de flavonoides

O teor total de flavonoides foi medido em 37,5 µL de amostra, 37,5 µL de metanol, 75 µL de Na_2NO_2 a 5% e 75 µL de $AlCl_3$ a 10%. Os meios de reação foram incubados durante 6 min no escuro e depois foram adicionados 125 µL de NaOH 1N. Foi utilizada uma curva padrão de rutina com a concentração variando de 0-3000 µM e a absorbância foi determinada a 510 nm. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de rutina por grama de massa seca.

Quantificação do teor de ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos foram determinados em meios de reação contendo 25 µL de extrato de estevia diluído em etanol 70 % na concentração 1:10, 50 µL de HCl 1,5 N, 50 µL de $NaNO_2$ a 10 %, 50 µL de Na_2MoO_4 a 10 %, 50 µL de NaOH 2N e 25 µL de H_2O MiliQ. A curva padrão foi feita usando concentrações de ácido cafeico que variaram entre 0-7000 µM. A absorbância a 490 nm foi determinada após 10 minutos de período de incubação. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de ácido cafeico por grama de massa seca.

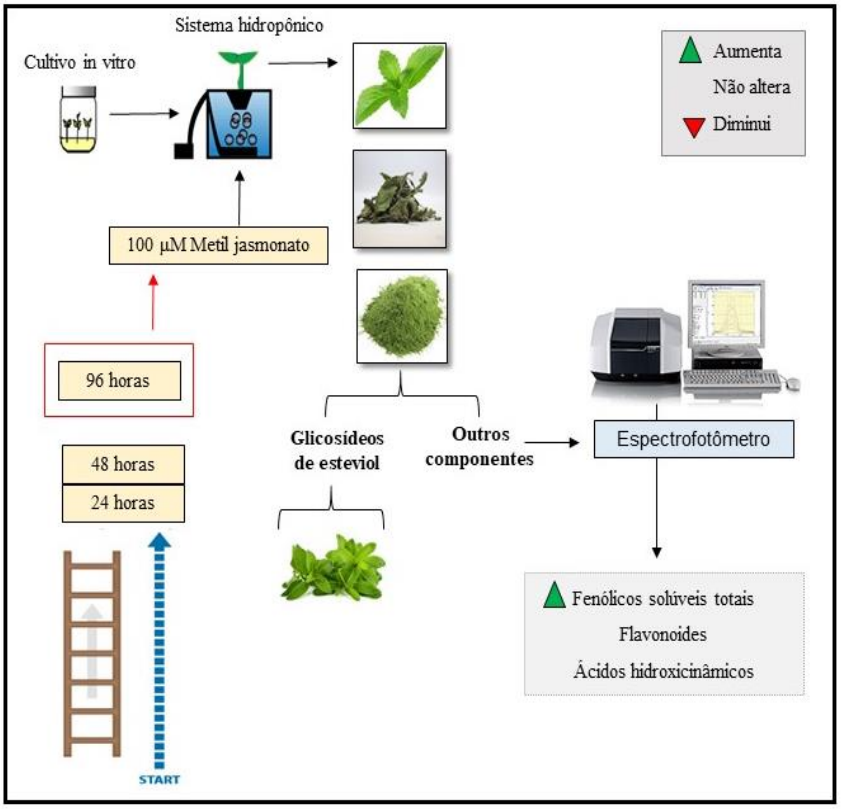
3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

As variações nos teores de fenólicos solúveis totais, flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos observados nas plantas controle e após a exposição ao MeJa são mostradas na Tabela 1. De um modo geral, os resultados indicam uma sensibilidade diferencial nos parâmetros avaliados, entre os tratamentos para o mesmo tempo, embora diferenças estatísticas foram verificadas somente para o conteúdo de fenólicos solúveis totais. A análise dos extratos obtidos revelou que a adição de MeJa (100 µM) provocou um incremento no conteúdo de fenólicos solúveis totais (842,38 µmol de eq. de ácido gálico por g^{-1} de massa seca), principalmente no tempo de exposição mais longo (96h), conforme demonstrado na Figura 1, reforçando o efeito positivo relatado na literatura, deste elicitor na acumulação de compostos fenólicos (WANG et al., 2009).

É importante ressaltar que o papel do MeJa como elicitor, vai além dos compostos fenólicos, pois engloba as três classes de metabólitos secundários (terpenoides, alcaloides e os fenilpropanoides) e além disso, o MeJa pode modular determinadas vias metabólicas primárias para fornecer às vias metabólicas secundárias os substratos necessários para a sua

síntese (ZHAO et al., 2005; PAUWELS et al., 2009; BROWSE, 2009; MEMELINK, 2009), de fato, estas informações comprovam que o MeJa é um forte candidato a ser usado na otimização da produção de metabólitos valiosos, pois desencadeia extensa reprogramação transcricional levando a ativação de vias metabólicas inteiras.

Figura 1- Representação esquemática da metodologia e dos resultados de quantificação de compostos fenólicos nos extratos etanólicos de tecidos foliares de *Stevia rebaudiana* após 96 horas de exposição ao metil jasmonato (MeJa).



Fonte: Lucho et al. (2018).

Em relação ao conteúdo de flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos nos extratos etanólicos dos tecidos foliares de estevia não foram possíveis observar diferenças significativas entre os tempos de exposição para o mesmo tratamento e nem entre os tratamentos para o mesmo tempo. Entretanto, cabe ressaltar que os valores máximos de conteúdo de flavonoides (493,03 µmol de eq. de rutina por g^{-1} de massa seca) e ácidos hidroxicinâmicos (642,07 µmol de eq. de ácido caféico por g^{-1} de massa seca) foram verificados às 96 h, embora esses níveis não tenham sido significativamente diferentes dos controles, mostram que plantas de estevia necessitam de um tempo maior de exposição para elevar os seus níveis de compostos.

De um modo geral, podemos perceber que o conteúdo de compostos fenólicos, após aplicação exógena de MeJa, são amplamente dependentes do tempo de exposição, pois percebe-se um incremento em todos os parâmetros, conforme o tempo de exposição aumenta. Neste sentido, será extremamente interessante explorar ainda mais os diversos papéis do MeJa sobre a síntese de compostos fenólicos, sobretudo em outros tempos de exposição. Além disso, uma outra abordagem pode ser usada para revelar os mecanismos adicionais de regulação positiva dos genes induzidos por MeJa, a fim de obter uma análise mais profunda em relação a expressão de genes que codificam para enzimas chaves da via de biossíntese dos fenilpropanoides.

Tabela 1 - Conteúdo de compostos fenólicos (fenólicos solúveis totais, flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos) em extratos de *Stevia rebaudiana* após três tempos de exposições (24, 48 e 96 horas) ao metil jasmonato (MeJa)

Conteúdo de Fenóis	Tempo (horas)	Controle	MeJa
Fenólicos solúveis totais	24	445,83 ±38,90 Aa	458,24 ± 31,65 Ab
Fenólicos solúveis totais	48	534,26 ± 15,13 Aa	494,70 ± 28,41Ab
Fenólicos solúveis totais	96	548,07 ± 19,81 Ba	842,38 ± 22,74 Aa
Flavonoides	24	306,44 ± 39,75Aa	325,20 ± 39,60 Aa
Flavonoides	48	370.80 ± 10,33 Aa	337,45 ± 7,18Aa
Flavonoides	96	356,59 ± 4,09 Aa	493,03 ± 11,22 Aa
Ácidos hidroxicinâmicos	24	473,60 ± 48,33 Aa	441,31 ± 58,57 Aa
Ácidos hidroxicinâmicos	48	540,92 ± 17,63 Aa	516,37 ± 13,31 Aa
Ácidos hidroxicinâmicos	96	592,48 ± 13,80 Aa	642,07 ± 19,20 Aa

*Cada ponto de dados representa as medições de cinco plantas individuais por repetição. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos para o mesmo tempo, enquanto letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tempos para o mesmo tratamento (Teste de Duncan P≤0.05). **Fonte:** Lucho et al. (2018).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento com MeJa pode ser considerado uma estratégia eficiente, uma vez que as plantas tratadas contêm os níveis mais elevados de compostos fenólicos solúveis totais. Entretanto, mais estudos são necessários para desvendar percepções importantes sobre o papel e a regulação exercida pelo MeJa sobre a síntese de metabólitos secundários.

REFERÊNCIAS

BROWSE, J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 183–205, 2009.

GIRI, C.C.; ZAHEER, M. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 126, p. 1–18, 2016.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **Calif Agric Exp Stn Circ**, v. 347, p. 1-32, 1950.

KARAKÖSE, H.; JAISWAL, R.; KUHNERT, N. Characterization and quantification of hydroxycinnamate derivatives in *Stevia rebaudiana* leaves by LC-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 10143–10150, 2011.

LÓPEZ-ORENES, A.; ROS-MARÍN, A.F.; FERRER, M.A.; CALDERÓN, A.A. Antioxidant capacity as a marker for assessing the in vitro performance of the endangered *Cistus heterophyllus*. **The Scientific World Journal**, p. 1–10, 2013.

LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; KONG, A.H. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on

the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132: p. 1121–1132, 2012.

MEMELINK, J. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1560–1570, 2009.

PAUWELS, L.; INZÉ, D.; GOOSSENS, A. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? **Trends Plant Science**,v. 14, p. 87–91, 2009.

RAMIREZ-ESTRADA, K.; HIDALGO, D.; MOYANO, E.; GOLENIOSWKI, M.; CUSIDÓ, R.M.; PALAZON, J. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. **Molecules**, v. 21, p. 1-24, 2016.

RUIZ, J.C.R.; ORDOÑEZ, Y.B.M.; BASTO, Á.M.; CAMPOS, M.R.S. Capacidad antioxidante de extractos foliares de dos variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni adaptadas al cultivo en México. **Nutricion Hospitalaria**, v. 31, p. 1163-1170, 2015.

SHUKLA, S.; MEHTA, A.; BAJPAIB, V.K.; SHUKLA, S. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Food and Chemical Toxicology, v.** 47, p. 2338-2343, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

WANG, Q.J.; ZHENG, L.P.; SIMA, Y.H.; YUAN, H.Y.; WANG, J.W. Methyl jasmonate stimulates 20-hydroxyecdysone production in cell suspension cultures of *Achyranthes bidentata*. **Plant Omics Journal**, v. 6, p. 116-120, 2013.

WANG, K., PENG, J.; CAO, S.; SHANG, H.; YANG, Z.; ZHENG, Y. Methyl Jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in Chinese Bayberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5809-5815, 2009.

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