

Efeito da aplicação de metiljasmonato no desenvolvimento de calêndula (*Calendula officinalis* L. – Asteraceae)

Methyl jasmonate in the development of Calendula (Calendula officinalis L. – Asteraceae)

Rosângela Magalhães de Oliveira
Cyntia Maria Wachowicz
Joceline Franco

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Bacharelado em Biologia – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)
Rua Imaculada Conceição, 1.155 – Bloco CCBS – Prado Velho
CEP 80215-901 – Curitiba – PR
Autor para correspondência: rooliveira.bio@gmail.com

RESUMO

Calendula officinalis (Asteraceae) é uma planta medicinal utilizada pelos seus efeitos anti-inflamatórios, antissépticos e cicatrizantes. Os jasmonatos são compostos formados a partir do ácido linolênico que interferem na síntese de metabólitos secundários. O objetivo deste trabalho foi verificar se a aplicação exógena de metiljasmonato em *C. officinalis* potencializa a síntese de metabólitos secundários e se é precursora de algum ajuste morfológico externo na espécie avaliada. A metodologia utilizada foi a cromatografia em camada delgada para caracterização fitoquímica dos extratos. Os parâmetros morfológicos avaliados foram comprimento da maior folha e número de folhas. A aplicação exógena de metiljasmonato nas concentrações testadas em *C. officinalis* não alterou o número de folhas e o comprimento da maior folha. Na análise de metabólitos secundários, todos os tratamentos apresentaram as mesmas substâncias (rutina e ácido clorogênico).

Palavras-chave: Ácido clorogênico; calêndula; metabólitos secundários; plantas medicinais; rutina.

ABSTRACT

Calendula officinalis (Asteraceae) is a medicinal plant used for its anti-inflammatory, anti-septic and healing effects. The methyl jasmonate compound is formed from linolenic acid and interferes with the synthesis of secondary metabolites. The aim of this work was to verify whether the exogenous application of jasmonate on *C. officinalis* enhances the synthesis of secondary metabolites and is precursor to some external morphological adjustments in the evaluated species. The methodology used was thin-layer chromatography for characterization of phytochemical extracts. The morphological parameters evaluated were the length of the longest leaf and number of leaves. The exogenous application of methyl jasmonate at concentrations tested in *C. officinalis* did not alter the number of leaves and the length of the longest leaf. In the analysis of secondary metabolites, all treatments showed the same substances (rutin and chlorogenic acid).

Keywords: Chlorogenic acid; marigold; medicinal plant; rutin; secondary metabolites.

Recebido: 30 set. 2012

Aceito: 22 nov. 2014

INTRODUÇÃO

A calêndula (*Calendula officinalis* L. – Asteraceae), planta medicinal de origem mediterrânea cujo principal efeito terapêutico está relacionado à cicatrização de tecido cutâneo, é também eficiente no tratamento de abscessos gástricos e inflamações vasculares e glandulares. As sementes de calêndula estão inseridas em frutos secos, típicos da família Asteraceae, denominados aquênios, que nessa espécie se apresentam recurvados. Os frutos formam-se apenas em flores liguladas, e não em tubuladas, que permanecem estéreis. Observam-se diferenças na forma e no tamanho dos aquênios, relacionadas com a posição da flor no capítulo, pois as flores mais externas produzem aquênios maiores (SILVEIRA *et al.*, 2002).

Por meio de reações químicas de identificação de metabólitos e análises cromatográficas, foram encontrados diversos grupos de compostos nas flores de *C. officinalis*, sendo os principais constituintes: princípio amargo calendulina e calendina, carotenoides, esteroides, sesquiterpenoides, triterpenoides, óleo essencial, flavonoides, resinas, mucilagem, ésteres de ácidos orgânicos, ácidos pentadecílico e salicílico, saponinas, álcoois, esteróis, triterpenos e taninos (KASPRZYK *et al.*, 1970).

Os jasmonatos são compostos com ação similar à do ácido jasmônico. Esse grupo de substâncias já foi encontrado em 206 espécies, incluindo musgos e fungos, o que sugere sua ampla distribuição no reino vegetal e em outros organismos. Sobre a biossíntese dos jasmonatos, sabe-se que são formados a partir do ácido linolênico por uma série de reações e que são encontrados em altas concentrações nos ápices de ramos e raízes, folhas jovens e frutos imaturos. Quanto ao transporte, ainda não há evidências claras de como são translocados de uma região de síntese para um local de ação (BIASI, 2002).

Os níveis de ácido jasmônico aumentam rapidamente em resposta ao dano causado por insetos herbívoros e desencadeiam a produção de muitas proteínas envolvidas na defesa anti-herbivoria (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A aplicação exógena de ácido jasmônico nas plantas inibe o crescimento de raízes, o crescimento de calos em cultura de tecidos, a embriogênese, a germinação de sementes, a germinação de grãos de pólen, a formação de gemas florais, a biossíntese de carotenoides e a formação de clorofila (BIASI, 2002). Por outro lado, também já foi demonstrado que o ácido jasmônico promove a diferenciação em cultura de tecidos, a formação de raízes adventícias, a quebra de dormência de sementes, a germinação de grãos de pólen em algumas espécies, o amadurecimento de frutos, a senescência e abscisão foliar, a formação de tubérculos, o fechamento dos estômatos, a degradação da clorofila, a respiração, a biossíntese de etileno e a síntese de proteínas (VIDAL-OLLIVIER *et al.*, 1989).

No presente trabalho foi escolhida a calêndula por conta de sua facilidade de crescimento e manejo e também por tratar-se de uma planta medicinal já utilizada na indústria farmacêutica pela sua ação cicatrizante e anti-inflamatória. Teve-se como objetivo verificar se a aplicação exógena de jasmonato nessa espécie potencializa a síntese de metabólitos secundários e se causa algum ajuste morfológico externo na espécie avaliada.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no período de 25 de abril a 1.º de novembro de 2008 e repetido no período de 5 de fevereiro a 12 de maio de 2009. A primeira etapa do experimento foi realizada em casa de vegetação no *Campus* São José da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), no município de São José dos Pinhais, Paraná. A segunda parte deu-se no laboratório de bioquímica da Usina Piloto da PUCPR.

Para ambas as etapas utilizaram-se sementes comerciais de calêndula da marca Top Seed, todas provenientes do mesmo lote. Na primeira fase, as sementes foram plantadas em bandejas de isopor contendo 288 células, que foram preenchidas com terra peneirada, coletada no bosque da PUCPR *Campus* São José, permanecendo em casa de vegetação por 30 dias e transplantadas aos 25 dias para vasos com substrato para floreira da marca Riggas®. Por causa da variação no tamanho das plantas, separaram-se 40 de acordo com tal classificação, sendo 20 plantas com tamanho de até 5 cm e 20 com tamanho de 5,1 a 10 cm. As plantas foram divididas em 4 parcelas com 10 plantas cada uma, de acordo com o tratamento que iriam receber: [I] plantas de até 5 cm que receberam

metiljasmonato (MeJa); [II] plantas de 5,1 a 10 cm que receberam MeJa; [III] plantas de até 5 cm que não receberam a substância (tratamento controle); [IV] plantas de 5,1 a 10 cm do controle.

Aos 74 dias do plantio, efetuou-se a primeira avaliação morfológica, sendo avaliados o tamanho da maior folha e a quantidade de folhas de cada indivíduo. A primeira aplicação de MeJa ocorreu aos 83 dias, seguida de mais três aplicações, aos 90, 97 e 104 dias, respectivamente, após o plantio. A solução de MeJa aplicada nas plantas foi a seguinte: 0,2243 ml de MeJa diluído em 10 ml de água destilada. Empregou-se metade dessa solução para cada tratamento. Para as aplicações foi utilizado como vaporizador um inalador posicionado a aproximadamente 2 cm de distância da planta, sendo cada uma vaporizada durante 1 minuto (figura 1).



Figura 1 – Aplicação experimental de metiljasmonato em plantas de calêndula (*C. officinalis* L. – Asteraceae).

Aos 133 dias as plantas passaram da casa de vegetação para o ambiente externo. Realizou-se a segunda avaliação morfológica aos 190 dias de idade das plantas. Após essa avaliação, as plantas foram cortadas em partes de aproximadamente 1 cm e colocadas sobre jornal para secar. A secagem foi feita ao ar, com a luz de uma lâmpada de 60 W, durante 7 dias.

Após a secagem, partiu-se para o processo de extração de óleos essenciais no Laboratório de Bioquímica da Usina Piloto da PUCPR, Campus Curitiba. A extração de óleos essenciais foi feita em aparelho do tipo Clevenger. Primeiramente, colocaram-se 50 g de folhas de calêndula e 100 ml de água deionizada em um balão de 500 ml. O óleo e a água sobem na forma de vapor pelo aparelho. Após percorrerem o condensador, voltam à forma líquida e são recebidos na porção de coleta; como o óleo e a água são imiscíveis, podem ser facilmente separados.

Na segunda etapa do experimento, as sementes foram plantadas em bandeja de isopor contendo substrato para floreira, marca Eucatex®. O plantio foi executado aos cinco dias do mês de fevereiro, e a bandeja, deixada em ambiente externo. O transplante deu-se aos 23 dias do mês de fevereiro, e as plantas foram colocadas em vasos de 11 cm de diâmetro com o mesmo substrato, totalizando 60 vasos que fariam parte do experimento.

Efetuaram-se três tratamentos: tratamento 0 – grupo controle; tratamento 1 – 0,25 ml de MeJa diluído em 250 ml de água deionizada (1:1.000); tratamento 2 – 0,25 ml de MeJa diluído em 500 ml de água deionizada (1:2.000). Os vasos foram separados em três blocos com 20 repetições cada, de acordo com o tratamento.

Passados 36 dias do transplante, deu-se início às avaliações morfológicas e às aplicações de MeJa. Realizaram-se no total quatro avaliações morfológicas e quatro aplicações da substância nas

mesmas concentrações e métodos listados anteriormente. As demais avaliações e aplicações foram feitas aos 43, 50 e 57 dias do plantio. Para a avaliação morfológica, contaram-se as folhas e mediu-se o comprimento da maior folha para determinar a altura. Para a aplicação de MeJa usou-se um inalador como vaporizador, e as plantas foram vaporizadas aos pares, cobertas por um pacote plástico preto, durante o período de 1 (um) minuto. Os vasos foram dispostos aleatoriamente, regados diariamente uma ou mais vezes ao dia, dependendo da precipitação. Ao término do experimento, cortaram-se as plantas em pedaços de aproximadamente 1 cm, que foram secos em estufa com temperatura média de 40 °C, por 24 horas.

Após a secagem, procedeu-se à cromatografia em camada delgada, empregando cromatoplaça de sílica-gel GF como fase estacionária, e mistura de ácido fórmico anidro – ácido acético glacial – água – acetato de etila (11:11:27:100), como fase móvel (FARMACOPÉIA..., 2002). Utilizaram-se 3 g de matéria seca de cada tratamento, sendo 1 g para cada repetição. Em um balão volumétrico de 250 ml, foram colocados 1 g de folhas e solução contendo 11,5 ml de etanol a 55% e 8,5 ml de água deionizada e, após, o material foi fervido sob refluxo durante 20 minutos. O extrato proveniente da fervura foi filtrado em algodão e armazenado em local protegido da incidência de luz.

Para a preparação das placas foram empregadas placas de vidro previamente lavadas com detergente e secas em estufa. Em um béquer, colocaram-se 30 g de sílica-gel com 60 ml de água destilada até se obter uma suspensão homogênea. Após, com auxílio de um bastão, a suspensão de sílica foi espalhada pela placa uniformemente, deixando uma parte desta sem a suspensão de sílica (espaço para manuseio da placa). As placas contendo a suspensão de sílica foram secas em estufa a 110 °C (a placa a ser utilizada não pode estar com ranhuras nem deformações na suspensão de sílica, ou isso poderá alterar os resultados). Após essa preparação, as placas foram medidas e marcadas a 1,5 cm da base, para demarcar o início da fase móvel e, a contar desse ponto, marcaram-se mais 10 cm, demarcando o final da fase móvel.

Para a aplicação das amostras nas placas, empregou-se um micropipetador calibrado para 30 µL. Produziram-se duas bandas por placa, com uma duplicata cada. As placas foram marcadas de acordo com a repetição, sendo A para o extrato das plantas controle, B para o extrato das plantas que receberam a solução 2 e C para o extrato das plantas que receberam a solução 3. Na primeira marcação da placa, adicionaram-se gota a gota os 30 µL. As placas com as soluções foram colocadas em cubas de vidro contendo a solução da fase móvel. A fase móvel sobe pela placa, carregando consigo a amostra e, quando estas chegam à marcação final, a placa é retirada da cuba, deixada para secar e analisada em luz ultravioleta. As placas devem apresentar manchas marrons (referentes à rutina) e azuis (correspondentes ao ácido clorogênico). As manchas são demarcadas e também é verificada a distância percorrida para calcular o Rf, que é expresso como:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXPERIMENTO 1

Na segunda avaliação realizada, verificou-se que as plantas maiores (5,1 a 10 cm) produziram maior número de folhas em relação às menores. Porém o comprimento da maior folha das plantas menores (0 a 5 cm) foi maior. Esses resultados sugerem não haver influência do metiljasmonato nas variáveis morfológicas avaliadas (figura 2).

Durante a extração de óleos essenciais, verificou-se a presença de espuma, o que dificultou a ação. A espuma pode ser devida à presença de saponinas, que são compostos não nitrogenados que se dissolvem em água originando soluções afrógenas (espumantes), por conta de sua ação tensoativa. Constituem um grupo heterogêneo muito comum em plantas medicinais, classificado em glicosídeos saponosídicos do tipo esteroide e do tipo triterpênico (PAIVA *et al.*, 2009).

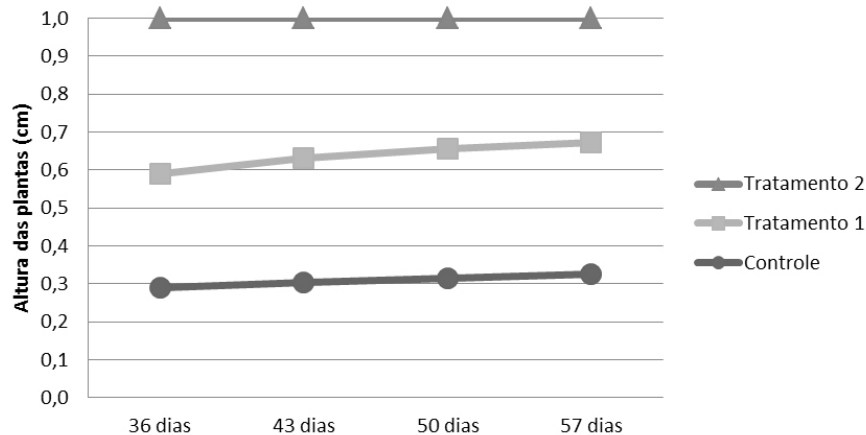


Figura 2 – Altura das plantas (cm) de *C. officinalis* com e sem a aplicação de MeJa. Tratamento 1: mais concentrado (1:1.000); tratamento 2: menos concentrado (1:2.000).

A espuma fez com que o material fosse levado juntamente com o vapor à câmara de condensação do aparelho. Mesmo com a diminuição do material, esse fato ocorria da mesma forma, não havendo então possibilidade de extração de óleos por esse método.

Durante a aplicação dos tratamentos, observou-se a presença de insetos sobre as folhas das plantas. Segundo Taiz e Zeiger (2009), o metiljasmonato é liberado pelas plantas em defesa contra patógenos e insetos. Portanto, a presença de insetos num dado momento do trabalho pode ter induzido as plantas a liberar o jasmonato para defesa. Em contrapartida, as plantas que receberam o MeJa apresentavam menor número de insetos, o que leva a acreditar que a substância aplicada teve efeito na defesa das plantas.

Os estresses térmicos e hídricos ocasionados pelo não funcionamento dos sistemas de irrigação e de ventilação na casa de vegetação podem ter induzido as plantas a liberar outros metabólitos secundários, mascarando algum efeito nos resultados atribuídos ao metiljasmonato.

Pela dificuldade em extrair os óleos essenciais com essa metodologia, optou-se pela repetição do experimento, na tentativa de avaliar as modificações nas plantas.

EXPERIMENTO 2

Analisando-se a altura das plantas (figura 2), percebe-se um melhor crescimento das que receberam a solução mais concentrada. Nas plantas que receberam a outra solução (menos concentrada), verificou-se um maior crescimento na primeira semana, porém depois se estabilizaram, não havendo um crescimento tão significativo como o da primeira semana. Nas plantas controle notou-se um crescimento menor que o das plantas que receberam os tratamentos.

Observou-se, assim como no primeiro experimento, a presença de insetos, como pulgões e formigas. Isso ocasionou uma queda no crescimento das plantas mais agredidas por esses insetos. As plantas controle sofreram mais com o ataque deles, ao contrário das plantas que receberam o tratamento mais concentrado, o que sugere que a aplicação de MeJa interferiu de alguma maneira na defesa da planta.

No tratamento menos concentrado não houve o mesmo resultado, pois a quantidade de plantas atacadas foi semelhante à de plantas do grupo controle. As plantas do tratamento mais concentrado mostraram uma melhora no crescimento em relação às do outro tratamento, pois as folhas estavam inteiras e sem sinais de ataque de insetos.

Verificou-se um aumento do número de folhas nas plantas controle e do tratamento 2 (figura 3). As plantas do tratamento 1 apresentaram uma queda no número de folhas da primeira para

a segunda semana, o que pode ser explicado pelo ataque de insetos e por um possível estresse hídrico, mas mostraram um crescimento maior em relação aos outros tratamentos na segunda semana de avaliação até o final do experimento, o que evidencia um melhor crescimento. A diferença no número de folhas pode ter ocorrido por causa da queda de algumas folhas entre os intervalos das semanas das avaliações.

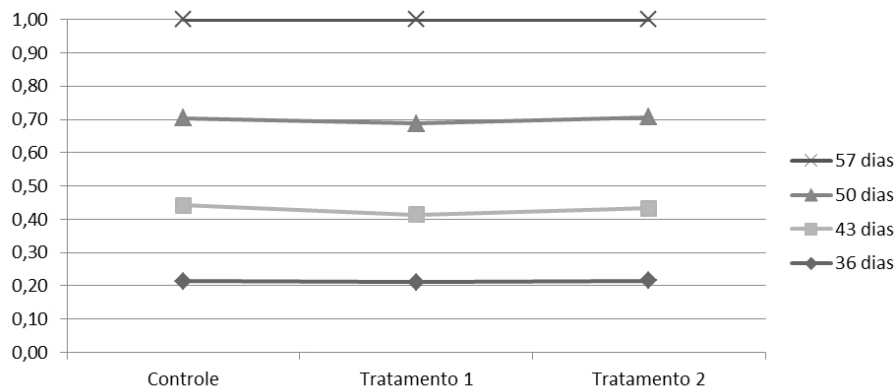


Figura 3 – Número de folhas em plantas de *C. officinalis* com e sem aplicação de MeJa. Tratamento 1: mais concentrado (1:1.000); tratamento 2: menos concentrado (1:2.000).

Assim como ocorreu no primeiro experimento, não houve a possibilidade de fazer a extração de óleos pelo método de hidrodestilação, pela provável concentração de saponinas na espécie estudada. A análise dos compostos foi realizada, então, por cromatografia em camada delgada.

A caracterização de flavonoides por cromatografia em camada delgada demonstrou não haver diferenças significativas no perfil cromatográfico entre as amostras nas condições experimentais estipuladas, sendo detectada a presença, em todas as amostras, de uma mancha característica de coloração marrom, que coincide com o valor de referência da rutina (R_f aproximadamente 0,35) e ácido clorogênico (R_f aproximadamente 0,55) (FARMACOPÉIA..., 2002). Todas as plantas, independentemente do tratamento, apresentaram as substâncias citadas anteriormente. Nessa metodologia não há como quantificar, somente identificar a presença das substâncias.

A rutina, segundo Harbone e Baxter (1983) e Keeler e Tu (1991), está presente nas inflorescências (capítulos) de *C. officinalis*. As atividades farmacológicas da rutina são antibacteriana, anti-hepatotóxica, antioxidante e anti-hemorroidal (VOLPATO, 2005). O termo ácido clorogênico é empregado para referir-se a uma família de ésteres formados por um ou mais ácidos aromáticos em que predominam os radicais representados pelos grupos -OH, -H e -OCH₃. O ácido clorogênico é normalmente metabolizado em plantas, frequentemente associado com a proteção delas contra ataques de insetos ou microrganismos (MORGANO *et al.*, 2001). No presente trabalho verificou-se a presença dessas substâncias também nas folhas.

CONCLUSÃO

Após a aplicação exógena de metiljasmonato em *C. officinalis*, na análise de metabólitos secundários, todos os tratamentos apresentaram as mesmas substâncias (rutina e ácido clorogênico). A aplicação exógena de metiljasmonato nas concentrações testadas não alterou o número de folhas e o comprimento da maior folha.

REFERÊNCIAS

Biasi LA. Reguladores do crescimento vegetal. In: Wachowicz CM, Carvalho RIN de. Fisiologia vegetal: produção e pós-colheita. Curitiba: Champagnat; 2002. p 63-94.

Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. Parte II, Fascículo 3. São Paulo: Atheneu; 2002. 263 p.

Harbone JB, Baxter H. Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. London: Taylor & Frost; 1983. 791 p.

Kasprzyk Z, Wojciechowski Z, Janiszowska W. Incorporation of 1-¹⁴C-acetate into glycosides of *Calendula officinalis*. *Phytochemistry*. 1970;9:561-564.

Keeler RF, Tu AT. Toxicology of plant and fungal compounds (Handbook of natural toxins) v. 6. New York: Marcel Dekker; 1991. 655 p.

Morgano MA, Camargo C, Pagel AP, Ferrão MF, Bragagnolo N, Ferreira MMC. Determinação simultânea dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em amostras de café cru por análise multivariada (PLS) e dados de espectroscopia por reflexão difusa no infravermelho próximo. II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Anais do 2.º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil; 2001; Vitória. p. 105-106.

Paiva ARQ de, Ribeiro KL, Gadelha TS, Gadelha CADE. Análise qualitativa da presença de saponinas e sua atividade hemolítica verificada nas amostras de *Acacia bonariensis* e *Panax ginseng*. XI Encontro de Iniciação à Docência. Anais do 11.º Encontro de Iniciação à Docência; 2009; João Pessoa, PB. p. 6CCENDBMMT05-P.

Silveira MAM, Villela FA, Tillmann MAA. Maturação fisiológica de sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.). *Revista Brasileira de Sementes*. 2002;24:31-37

Taiz L, Zeiger E. Fisiologia vegetal. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2009. 918 p.

Vidal-Ollivier E, Elias R, Faure F. Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med*. 1989;55(1):73-74.

Volpato AMM. Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico [tese – Doutorado em Ciências]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005. 133 p.