

**Universidade Federal de Pelotas
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal**



Tese

**Estudos fisiológicos e bioquímicos em plantas de *Amaranthus cruentus*
L. (Amaranthaceae) submetidas à elicitación com metil jasmonato e ácido
salicílico**

Gabriele Espinel

Pelotas, 2020.

Gabriele Espinel

**Estudos fisiológicos e bioquímicos em plantas de *Amaranthus cruentus*
L. (Amaranthaceae) submetidas à elicitación com metil jasmonato e ácido
salicílico**

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

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Deuner,
Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Eugenia Jacira Bolacel Braga,
Dr.^a Alírcia Moraes Kleinowski

Pelotas, 2020.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

E77 Espinel, Gabriele

Estudos fisiológicos e bioquímicos em plantas de *Amaranthus cruentus* L. (Amaranthaceae) submetidas à elicitación com metil jasmonato e ácido salicílico / Gabriele Espinel ; Sidnei Deuner, orientador ; Eugenia Jacira Bolacel Braga, Alírcia Moraes Kleinowski, coorientadoras. — Pelotas, 2020.

143 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Amaranto. 2. Propriedades nutraceuticas. 3. Compostos bioativos. 4. Cultivo *in vitro*. 5. Sistema hidropônico. I. Deuner, Sidnei, orient. II. Braga, Eugenia Jacira Bolacel, coorient. III. Kleinowski, Alírcia Moraes, coorient. IV. Título.

Gabriele Espinel

Estudos fisiológicos e bioquímicos em plantas de *Amaranthus cruentus* L. (Amaranthaceae) submetidas à elicitación com metil jasmonato e ácido salicílico

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Fisiologia Vegetal pelo Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 31 de março de 2020.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sidnei Deuner (Orientador)
Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras

Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga (Co - orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a. Simone Lucho
Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Luciano do Amarante
Doutor em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas

Dr. Márcio Paim Mariot
Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Marcelo do Amaral Nogueira (suplente)
Doutor em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico

À minha família. À minha mãe, Rosa (*in memoriam*)
por estar sempre ao meu lado.

Agradecimentos

Primeiramente a DEUS, pela saúde, proteção, acompanhamento e sabedoria em todos os momentos da minha vida.

A minha família, pelo apoio, carinho, compreensão, paciência e incentivo incondicionais.

Ao meu namorado, amigo, companheiro, Daniel Rutz por todo o apoio, amor e paciência.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao meu orientador, Dr. Sidnei Deuner, pela amizade, companheirismo, ensinamentos, dedicação e orientação durante essa trajetória.

A minha co-orientadora, Eugenia Jacira Bolacel Braga pelo exemplo de profissionalismo.

A minha também co-orientadora, Alitcia Kleinowski, pela paciência, amizade, parceria, pelas conversas, risadas e pelos choros! Por ela sempre acreditar em mim e sempre desafiar-me.

Ao Professor Doutor Willian Barros pelo valioso ensinamento.

Ao Professor Doutor Rui Zambiasi pela disponibilidade e parceria.

Aos meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em especial ao grupo do Laboratório de Nutrição de Plantas, pelo excelente convívio e também pela ajuda na elaboração deste trabalho. Vocês foram muito importantes nessa conquista, obrigada pela amizade e companheirismo.

As minhas amigas e parceiras de corrida, Paulinha Echevengué, Talita Rodrigues Leivas e Thielen Rodrigues.

A minha amiga e personal, Roberta Malaguez, por todo apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Pelotas, todos seus funcionários, em especial àqueles que em diversos momentos contribuíram com nossas pesquisas e com a manutenção de nossos espaços.

Agradeço ao PPG-Fisiologia Vegetal, em especial aos professores que contribuíram com a minha formação básica em Fisiologia vegetal.

Agradeço à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão das bolsas de doutorado, que permitiram a dedicação total e exclusiva a minha pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito do trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Resumo

ESPINEL, Gabriele. **Estudos fisiológicos e bioquímicos em plantas de *Amaranthus cruentus* L. (Amaranthaceae) submetidas à elicitación com metil jasmonato e ácido salicílico**. Orientador: Sidnei Deuner. 2020. 143 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Programa de Pós - Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Plantas de amaranto apresentam inúmeros compostos bioativos os quais são amplamente empregados em diversos setores industriais. Porém, por serem produzidas em pequenas quantidades pelos vegetais, tornam-se insuficientes para atender à demanda comercial. Nesse contexto, a elicitación surge como o método mais eficaz para aumentar a síntese dessas substâncias. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar as respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas de amaranto na presença dos reguladores de crescimento metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), na concentração de 100 μ M, após 24, 48, 72 e 96 horas da aplicação dos mesmos, nos diferentes métodos de cultivo: in vitro e hidropônico. Assim, foram conduzidos quatro estudos, sendo o primeiro responsável por desenvolver protocolos de estabelecimento e multiplicação in vitro para a espécie *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, para obtenção de plantas com condições fitossanitárias adequadas para possível exploração dos seus compostos bioativos. Os resultados evidenciaram o efeito da redução da concentração de sais e da sacarose do meio MS sobre variáveis morfogênicas em plantas micropropagadas, viabilizando ainda a redução dos custos de produção. No segundo estudo, o principal objetivo foi analisar a capacidade elicitora do MeJa e AS para incrementar a produção de metabólitos bioativos e o ajustamento osmótico em plantas cultivadas in vitro. Para isso, ocorreu a micropropagação da espécie conforme descrito, sendo esta posteriormente submetida aos elicitores MeJa e AS, adicionados ao meio de cultivo, na concentração de 100 μ M, além do tratamento controle, isento dos mesmos. As coletas do material vegetal para análise ocorreram após 24, 48, 72 e 96 horas. A presença dos reguladores de crescimento promoveu o acúmulo de flavonoides e amarantina e o MeJa induziu a realização do ajuste osmótico, superando a condição de estresse imposta. Os mesmos tratamentos anteriormente citados foram também testados no sistema hidropônico de cultivo, gerando outros dois estudos. Em um deles, o objetivo foi avaliar o ajuste osmótico, o incremento da produção de metabólitos bioativos bem como a capacidade antioxidante de plantas de *A. cruentus*. Os resultados observados demonstraram que os reguladores de crescimento promoveram a realização do ajuste osmótico em condições de hidroponia, apresentando aumentos expressivos nos teores de compostos como betalaínas e flavonoides, elevando ainda a capacidade antioxidante. Por fim, o último estudo objetivou avaliar o índice de pigmentos fotossintéticos, as capacidades de ajuste osmótico e antioxidante, além do conteúdo de carboidratos em plantas de *A. cruentus*. As respostas obtidas demonstraram que a elicitación promoveu aumento nos índices de clorofila e nitrogênio, especialmente às 48 horas após a aplicação. O AS estimulou a síntese de prolina, ao contrário do MeJa, o qual promoveu o ajuste osmótico possivelmente através de outros osmólitos. A presença dos elicitores alterou ainda a homeostase

redox das plantas sendo o H_2O_2 gerado possível indutor de metabólitos secundários. E, por fim, observou-se que MeJa e AS são capazes de incrementar o teor de carboidratos, provavelmente pelo aprimoramento dos processos fotossintéticos.

Palavras - chave: Amarantho. Propriedades nutracêuticas. Compostos bioativos. Cultivo in vitro. Sistema hidropônico.

Abstract

ESPINEL, Gabriele. **Physiological and biochemical studies in *Amaranthus cruentus* L. (Amaranthaceae) plants submitted to elicitation with methyl jasmonate and salicylic acid.** Advisor: Sidnei Deuner. 2020. 143 f. Thesis (Doctoral in Plant Physiology) - Graduate Program in Plant Physiology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Amaranth plants have numerous bioactive compounds which are widely used in various industrial sectors. However, as they are produced in small quantities by vegetables, they become insufficient to attend commercial demand. In this context, elicitation emerges as the most effective method to increase the synthesis of these substances. Thus, the present study aimed to characterize the physiological and biochemical responses of amaranth plants in presence of the growth regulators methyl jasmonate (MeJa) and salicylic acid (AS), at a concentration of 100 μ M, after 24, 48, 72 and 96 hours of application, in different cultivation methods: in vitro and hydroponic. Thus, four studies were conducted, the first being responsible for developing the protocol of multiplication and establishment in vitro of *Amaranthus cruentus* L. BRS Alegria, to obtain plants with adequate phytosanitary conditions for possible exploration of their bioactive compounds. Results showed the effect of reducing the concentration of salts and sucrose of the MS medium on morphogenic variables in micropropagated plants, also enabling the reduction of production costs. In the second study, the main objective was to analyze the ability of MeJa and AS to increase the production of bioactive metabolites and osmotic adjustment in plants grown in vitro. For this, the micropropagation of the specie occurred as described, which was subsequently submitted to the elicitors MeJa and AS, added to the culture medium, at a concentration of 100 μ M, in addition to the control treatment, exempt from them. The collection of plant material for analysis occurred after 24, 48, 72 and 96 hours. The presence of growth regulators promoted the accumulation of flavonoids and amarantine and MeJa induced the performance of osmotic adjustment, overcoming the imposed stress condition. The same treatments previously mentioned were also tested in the hydroponic cultivation system, generating two other studies. In one of them, the objective was to evaluate the osmotic adjustment, the increase in the production of bioactive metabolites as well as the antioxidant capacity of *A. cruentus* plants. The observed results showed that the growth regulators promoted the performance of the osmotic adjustment in hydroponic conditions, presenting expressive increases in the contents of compounds such as betalains and flavonoids, also increasing the antioxidant capacity. Finally, the last study aimed to evaluate the photosynthetic pigment index, osmotic adjustment and antioxidant capacities, as well as the carbohydrate content in *A. cruentus* plants. The answers obtained showed that the elicitation promoted an increase in the levels of chlorophyll and nitrogen, mainly 48 hours after application. AS stimulated the synthesis of proline, unlike MeJa, which promoted osmotic adjustment possibly through other osmolytes. The presence of elicitors also changed the redox homeostasis of the plants, with H_2O_2 generated as a possible inducer of secondary metabolites. And finally, it

was observed that MeJa and AS are able to increase the carbohydrate content, probably due to the improvement of photosynthetic processes.

Keywords: Amaranth. Nutraceutical properties. Bioactive compounds. In vitro cultivation. Hydroponic system.

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1 Altura (A), número médio de gemas (B), massa fresca de parte aérea (MFPA) (C), massa seca de parte aérea (MSPA) (D), comprimento de raízes (E) e massa seca de raízes (MS Raízes) (F) em plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas *in vitro*, por 35 dias, em meio de cultura com diferentes composições. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.....30

Figura 2 Número médio de brotos em plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas *in vitro*, por 35 dias, em meio de cultura com diferentes composições. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.....33

Capítulo II

Figura 1 Teor de flavonoides em plantas de *A. cruentus* após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo *in vitro* na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$. Valores médios considerando os diferentes elicitores, independente do tempo de exposição.....41

Figura 2 Teor de amarantina em plantas de *A. cruentus* após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo *in vitro* na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$. Valores médios considerando os diferentes elicitores, independente do tempo de exposição. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).....41

Figura 3 Teores de betanidina (A), betanina (B) e miraxantina (C) em plantas de *A. cruentus* após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo *in vitro* na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.
.....44

Figura 4 Teores de prolina (A), glicina betaína (B) e potencial osmótico (C) em plantas de *A. cruentus* após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em in vitro na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$46

Capítulo III

Figura 1 Teor de glicina betaína (A-B) e potencial osmótico (C-D) presentes em tecidos foliares (A e C) e caulinares (B e D) de plantas de *Amaranthus cruentus*, cultivadas em sistema hidropônico, na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 µM, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$60

Figura 2 Atividade da enzima fenilalanina amônia – liase (FAL) (A-B) e teor de ácidos hidroxicinâmicos (C-D) presentes em tecidos foliares (A e C) e caulinares (B e D) de plantas de *Amaranthus cruentus*, cultivadas em sistema hidropônico, na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 µM, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$63

Figura 3 Fenóis solúveis totais (FST) presentes em tecidos foliares (A) e caulinares (B) de plantas de *Amaranthus cruentus*, cultivadas em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 µM, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$65

Figura 4 Teor de flavonoides presentes em tecidos foliares (A) e caulinares (B-C) de plantas de *Amaranthus cruentus*, cultivadas em sistema hidropônico, na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 µM, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$68

Figura 5 Teores de quercetina (A) e rutina (B) presentes em tecidos caulinares de plantas de *Amaranthus cruentus* cultivadas em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 µM, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{...}$70

Figura 6 Teores de betanina (A-B) e betanidina (C-D) presentes em tecidos foliares e caulinares de plantas de *Amaranthus cruentus* cultivadas em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 µM, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{...}$73

Figura 7 Teores de miraxantina (A-B) e amarantina (C-D) presentes em tecidos foliares e caulinares de plantas de *Amaranthus cruentus* cultivadas em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 µM, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{...}$76

Figura 8 Capacidade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP (A-B), DPPH (C-D) e ABTS (E-F) em tecidos foliares e caulinares de plantas de *Amaranthus cruentus* cultivadas em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 µM, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{...}$79

Capítulo IV

Figura 1 Índice de clorofila (Chl) (A), índice de balanço de nitrogênio (NBI) (B) e índice de flavonoides (Flv) (C) em plantas de *A. cruentus* após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada

tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$90

Figura 2 Teor de prolina (A e B) e potencial osmótico (C e D) presentes em tecidos foliares e radiculares de plantas de *A. cruentus* após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$93

Figura 3 Atividade das enzimas Superóxido dismutase (A), Ascorbato peroxidase (B) e Catalase (C) em plantas de *A. cruentus* após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$96

Figura 4 Conteúdo de H_2O_2 (A) e Peroxidação Lipídica (B) em plantas de *A. cruentus* após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$97

Figura 5 Teores de nitrato (A e B), sacarose (C e D) e amido (E) presentes em tecidos foliares e radiculares de plantas de *A. cruentus* após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$99

Figura 6 Teores de açúcares solúveis totais (A e B) e aminoácidos solúveis totais (C e D) presentes em tecidos foliares e radiculares de plantas de *A. cruentus* após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u_{\dots}$105

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1 Porcentagens de sobrevivência e contaminação observadas no estabelecimento *in vitro* de plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivados durante 35 dias em diferentes meios de cultura.....29

Tabela 2 Porcentagens de sobrevivência e contaminação observadas no estabelecimento *in vitro* de explantes de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivados durante 35 dias em diferentes frascos e vedações.....29

Capítulo II

Tabela 1 Análise de correlação entre compostos bioativos (flavonoides, betanidina, betanina, amarantina e betaxantina), potencial osmótico, prolina e glicina betaína em plantas de *A. cruentus* cultivadas *in vitro* e mantidas na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS) nas concentrações de 0 (controle) e 100 µM, por 24, 48, 72 e 96 horas. **p<0,01, *p<0,05. que: quercetina; bet: betanidina; ama: amarantina; pro: prolina; po: potencial osmótico; gb: glicina betaína; bnn: betanina; mir: miraxantina.....49

Sumário

Introdução geral.....	18
1 Capítulo I: Estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Amaranthus cruentus</i> L., cv. BRS Alegria.....	25
1.1 Introdução	25
1.2 Material e métodos.....	26
1.3 Resultados e discussão.....	28
1.4 Conclusões	34
2 Capítulo II: Incremento de moléculas bioativas através do uso de reguladores de crescimento em plantas de <i>Amaranthus cruentus</i> L., cultivadas in vitro.....	34
2.1 Introdução	34
2.2 Material e métodos.....	37
2.3 Resultados e discussão.....	40
2.4 Conclusões.....	51
3 Capítulo III: Produção de compostos bioativos em <i>Amaranthus cruentus</i> L. em cultivo hidropônico na presença de elicitores.....	52
3.1 Introdução	52
3.2 Material e métodos	55
3.3 Resultados e discussão	59
3.4 Conclusões.....	80
4 Capítulo IV: Respostas antioxidantes e do metabolismo de carboidratos em plantas de <i>Amaranthus cruentus</i> cv BRS Alegria submetidas à elicitação por metil jasmonato e ácido salicílico	80
4.1 Introdução	80
4.2 Material e métodos.....	83
4.3 Resultados e discussão.....	88
4.4 Conclusões	108
Considerações finais	109
Referências	110

Introdução geral

O amaranto (*Amaranthus* spp.) é um pseudocereal pertencente à família *Amaranthaceae*, ordem *Caryophyllales*. Suas sementes constituem boa fonte de amido (58-66%), proteínas (13-19%) com equilíbrio adequado de teor de aminoácidos essenciais, fibra alimentar (14–16%) e lipídeos (5-13%). Além disso, detém minerais como Ca, Mg, Fe, K, Zn e vitaminas do Complexo B (NASCIMENTO et al., 2014; LAMOTHE et al., 2015; GUARDIANELLI et al., 2019). Possui ainda maior concentração de proteínas em relação aos três cereais básicos mais importantes: arroz, trigo e milho, os quais contribuem globalmente com mais da metade da proteína total (FAO, 2009). Por suas promissoras qualidades nutricionais, diversas pesquisas têm demonstrado a inserção da referida espécie em múltiplos formulados alimentares, enriquecendo nutricionalmente outros produtos ou mesmo sendo comercializada individualmente (SINDHUJA et al., 2005).

As sementes contêm óleo altamente insaturado, esqualeno, tocoferóis e proteínas sem glúten e, portanto, representam ótimo substituto aos cereais (BERGANZA et al., 2003; CASELATO - SOUZA; AMAYA-FARFÁN, 2012). Esse interesse ressurgente é expresso na redescoberta de culturas ancestrais como alimentos funcionais, o que pode oferecer alternativa importante para as pessoas afetadas pela doença celíaca (COOPER, 2015), sendo também economicamente relevante, já que o mercado de alimentos isentos de glúten movimentava mais de US\$ 1,5 bilhão.

As evidências históricas demonstram que a domesticação e o cultivo de *Amaranthus* ocorreram há cerca de 8.000 anos através da civilização maia do sul e da América Central (SAUER, 1950a; SAUER, 1950b; PAL; KHOSHOO, 1972; EARLY, 1977; HAUGHTON, 1978; LEHMAN, 1994). Os astecas atribuíam sua força às propriedades mágicas da espécie. Devido a isso, foi usado em práticas religiosas. Mas, nos anos 1500, os conquistadores espanhóis proibiram seu cultivo visando suprimir a cultura e religião local.

A importância medicinal desta cultura é conhecida há muito tempo (ADEBOOYE et al., 2008). Seus efeitos curativos são muitas vezes atribuídos a diferentes componentes antioxidantes (GORINSTEIN et al., 2007).

Dentre eles estão os flavonoides os quais constituem o grupo mais importante de metabólitos secundários e bioativos em plantas (KIM et al., 2003). São reconhecidos por suas propriedades promotoras de saúde, as quais incluem proteção contra doenças cardiovasculares, câncer e outras patologias (GHASEMZADEH et al., 2012). De acordo com Kalinova; Dadakova (2008), o teor de rutina, flavonoide presente em plantas de amaranto, pode ser importante do ponto de vista dietético, pois a ingestão de alimentos com maior teor de flavonoides constitui elemento primordial na prevenção de doenças civilizacionais. O consumo de 100 g de sementes de amaranto poderia incrementar significativamente a obtenção diária de tais moléculas, garantindo em torno de 5-10 mg dia⁻¹. Esses dados corroboram o potencial emprego da espécie como alimento funcional.

Outros compostos de grande interesse comercial são as betalainas, pigmentos nitrogenados solúveis em água os quais compreendem as betacianinas, vermelho-violeta e as betaxantinas, amarelas (STINTZING; CARLE, 2004), são um grupo bioquimicamente diverso de metabólitos secundários com inúmeras funções biológicas (STINTZING; CARLE, 2007). Dentre elas, o envolvimento como antioxidantes em defesa de plantas contra estresses bióticos e abióticos (STRACK et al., 2003). A capacidade de sintetizá-las foi observada somente na ordem Caryophyllales (GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA, 2013).

Esses compostos são empregados como corantes em alimentos, fármacos e cosméticos, sendo muito requeridos devido às preocupações dos consumidores sobre alternativas aos sintéticos e também pela atividade biológica que apresentam (STINTZING; CARLE, 2007; MORENO et al., 2008). Uma das propriedades mais interessantes das betalainas é sua estabilidade ao longo de amplo intervalo de pH, o qual varia de 3,0 a 7,0, tornando-as particularmente adequadas para uso em vasta gama de alimentos, onde a coloração com antocianinas geralmente falha (STINTZING; CARLE, 2004). Na União Europeia o uso de betalainas como aditivo natural alimentar já foi aprovado (RAVICHANDRAN et al., 2011).

Os vegetais têm sido usados para os tratamentos curativo ou paliativo de diversas doenças desde os tempos primórdios (KUZEL et al., 2009). O vasto histórico e uso mundial de plantas medicinais e fitoquímicos demonstram a

eficácia da tradicional prática na prevenção do surgimento e progressão de doenças crônicas.

Grande parte dos componentes benéficos à saúde humana, provenientes dos alimentos de origem vegetal, deve-se ao metabolismo secundário das plantas (GAWLIK-DZIKI, 2013). Estes compostos não possuem papel reconhecido na manutenção de processos fundamentais do ciclo vegetal, mas são essenciais na interação com o ambiente. Na natureza, regem os mecanismos de alelopatia, servem como atrativos para polinizadores e dispersantes de sementes, (FERNANDEZ et al., 2006; ORMEÑO et al., 2007; FERNANDEZ et al., 2013). São responsáveis pela comunicação entre vegetais, alertando plantas vizinhas para a presença de herbívoros, desempenhando atividade imprescindível na defesa contra o ataque de pragas e patógenos (ARIMURA et al., 2000; KARBAN et al., 2014). Todas essas interações entre plantas e outros organismos podem ser componentes-chave do funcionamento geral de um ecossistema (CHOMEL et al., 2014). Além da relevante função nas plantas, são ainda promotores de saúde e agregam valor econômico, elevando a importância comercial dos vegetais.

Apesar do desenvolvimento de inúmeras drogas sintéticas, as espécies medicinais mantêm importância considerável no mercado mundial, com opções para fitoterapia, nutracêuticos e cosméticos. Tal fato deve-se, especialmente, por substâncias sintéticas não apresentarem a mesma eficácia e especificidade. Além disso, a segurança do uso de antioxidantes e pigmentos artificiais vem sendo questionada pela correlação dos mesmos com doenças carcinogênicas. Assim, há crescente interesse em substituintes naturais, especialmente aqueles com origem vegetal.

Nas últimas décadas, o uso de fitoterápicos se expandiu globalmente e os medicamentos ganharam atenção considerável devido ao seu bom desempenho terapêutico (NORMILE, 2003). A OMS (Organização Mundial de Saúde) relata que 80% de toda população depende dessa linha para cuidados primários de saúde (RASKIN, 2002). Para explicitar a importância dos estudos fitoquímicos e bioprospecção de plantas medicinais, aproximadamente metade de todos os medicamentos licenciados e registrados mundialmente no período anterior ao ano de 2010, foram produtos naturais ou seus derivados sintéticos (DIAS et al., 2012). Morfina, codeína, digoxina, colchicina são alguns dos exemplos de

compostos extraídos das plantas que até hoje movimentam o bilionário mercado farmacêutico (NAMDEO, 2007).

Apesar da exímia importância dos metabólitos vegetais, a produção comercial dos mesmos tem ficado aquém da esperada. São inúmeros os fatores os quais prejudicam a plena obtenção das moléculas. Dentre eles, a escassez de quantidade significativa de matéria fresca altamente pigmentada, falta de métodos simples e eficazes de extração e purificação destes produtos (KHAN; GIRIDHAR, 2015). Além disso, o baixo rendimento de metabólitos de interesse, disponibilidade sazonal, rápida deterioração, qualidade inconsistente dos produtos e sua acelerada degradação constituem outros fatores limitantes no que tange a obtenção de produtos provenientes de plantas (LILA 2004; RAM et al., 2011).

E, ainda, muitas espécies as quais contêm compostos de alto valor são de difícil cultivo ou estão tornando-se ameaçadas devido à coleta excessiva. Ademais, a síntese química dos fitoquímicos não é economicamente viável por suas estruturas apresentarem alta complexidade e componentes demasiadamente específicos. Outro importante aspecto é o fato de tais moléculas serem restritas a órgãos específicos da planta, estádios de crescimento e desenvolvimento distintos ou dependentes de condições relacionadas às estações do ano, estresse, disponibilidade de nutrientes da espécie ou gênero (RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016).

Assim, visando atender a imensa demanda comercial, técnicas como modificação genética, manejo agrônomo e aplicação de elicitores são exemplos de ferramentas utilizadas para aumentar os teores desses fitoquímicos. Destaque para o último com maior aplicabilidade devido ao baixo custo, simplicidade e efetividade de uso (ANGELOVA et al., 2006; MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2008; MORA - PALE et al., 2013).

Plantas tratadas com elicitores bióticos e/ou abióticos causam respostas de defesa semelhantes ao efeito do ataque de patógenos ou estímulos ambientais e caracterizam-se por ser uma das formas mais eficazes para aprimorar o rendimento de metabólitos relevantes (WU; LIN, 2002).

Seus intensos e rápidos efeitos estimulantes no metabolismo vêm atraindo consideráveis atenção e esforços de pesquisadores. Devido aos bons efeitos no acúmulo de metabólitos secundários, os fitohormônios mais

comumente empregados são metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), os quais são responsáveis pela regulação de inúmeros processos no metabolismo vegetal (FARZINEBRAHIMI et al., 2014).

A expressão de muitos traços relacionados à defesa de plantas é mediada por ambos os hormônios. A importância de ambos como reguladores da resistência vegetal levou à hipótese de que aplicações exógenas poderiam auxiliar no manejo de pragas em várias culturas economicamente importantes. E, de fato, o fornecimento externo desses hormônios induzem respostas similares às obtidas durante estresses (ERB et al., 2012).

O MeJa é produzido amplamente nas plantas, através da via octadecanoide, a partir da oxigenação do ácido α -linoleico, sendo comumente referido como "hormônio do estresse" (CHEONG; CHOI, 2003). Atua contra patógenos necrotróficos e insetos mastigadores (EDER; COSIO, 1994; WASTERACK; STRNAD, 2017). É volátil, possibilitando a sinalização a outras plantas vizinhas para que estas aumentem a concentração destes compostos (WASTERACK; STRNAD, 2017).

Possui papel chave nos processos regulatórios de transdução de sinal de respostas defensivas, aumentando a produção de metabólitos secundários em vegetais (ZHAO et al., 2010). Apresenta ainda envolvimento em diversos outros processos, como germinação de sementes, crescimento radicular, fertilidade, amadurecimento de frutos e senescência (CREELMAN; RAO, 2002; WASTERACK; HAUSE, 2002), além de participar de respostas referentes a condições ambientais adversas (WASTERACK, 1997).

O AS é um composto fenólico de ocorrência natural, derivado do ácido benzóico, envolvido na regulação da expressão protéica associada à patogênese (MIURA; TADA, 2014). É relacionado à resistência sistêmica adquirida, mecanismo iniciado após o ataque de patógenos e que pode garantir maior tolerância aos vegetais em ataques futuros (TAIZ; ZEIGER, 2013). Atua ainda como importante molécula de sinalização em várias respostas fisiológicas, a exemplo da germinação de sementes, fechamento estomático, floração e estresses como temperaturas extremas e salinidade (KUMAR, 2014). Assim como o MeJa, também promove a síntese de metabólitos secundários em vegetais (HAYAT et al., 2010).

A exposição de uma planta a estresses instiga a ativação de vias enzimáticas capazes de alterar o conteúdo de metabólitos secundários bioativos (EDER; COSIO, 1994). Neste sentido, a micropropagação de plantas medicinais é uma técnica amplamente utilizada para a produção de compostos e produtos naturais utilizados industrialmente. Em comparação com os métodos tradicionais, apresenta muitas vantagens, como a independência da variação sazonal para propagação massal, identificação e produção de clones com as características desejadas e a capacidade de manipular o microambiente para aumentar a produção do metabólito de interesse (ATTIA et al., 2012). O uso de elicitores in vitro tem sido uma das estratégias mais eficazes para aumentar a formação de metabólitos secundários, incluindo a aplicação de certos hormônios associados ao estresse em plantas (JALLEL et al., 2009; PEROTTI et al., 2010; KLEINOWSKI et al., 2013).

Outra alternativa de cultivo aplicável à ampliação do conteúdo de moléculas alvo é a hidroponia. Esse método consiste no fornecimento de nutrientes dissolvidos diretamente na água de irrigação fornecida (MAGGINI et al., 2014). Grande vantagem desta técnica é a possibilidade de expor deliberadamente os vegetais aos elicitores, facilitando os incrementos nas concentrações de metabólitos (BRECHNER et al., 2007; RAHIMI et al., 2012).

Extensa quantidade de culturas hidropônicas vem sendo produzidas em países para atender a demanda do consumidor. Nas últimas décadas, pesquisas com essa técnica de cultivo obtiveram aumento expressivo, especialmente no sentido de elevar a produtividade e solucionar as limitações relacionadas ao sistema (LEE; LEE, 2015).

Além de todos os aspectos acima comentados, prevê-se que a população mundial alcance mais de 9,3 bilhões de pessoas até o ano de 2050, o que aumentará a demanda por alimentos. Ao mesmo tempo, as mudanças climáticas e a deterioração do solo representam ameaças cada vez mais sérias à produção (LOBELL et al., 2011). Para enfrentar esses desafios, melhorias nas culturas devem não apenas garantir a disponibilidade de alimentos, mas adicionalmente, apresentar padrões alimentares mais nutritivos (MCCOUCH et al., 2013; MUÑOZ et al., 2017). Outra característica altamente desejável é que estas espécies também possuam compostos bioativos, garantindo benefícios adicionais à saúde humana (SIRÓ et al., 2008). Tal situação torna crescente o

interesse em novas fontes alimentares, com a iminente necessidade de explorar melhor a biodiversidade vegetal (MUÑOZ et al., 2017). Neste sentido, a importância do amaranto é corroborada por consistir em valiosa fonte nutricional a qual, praticamente, todos os seus órgãos apresentam elementos funcionais, podendo ser empregados para os mais diversos fins.

Além do valor comercial gerado pelas propriedades nutracêuticas apresentadas pela referida espécie, esta ainda detém considerável rusticidade, com resistência a estressores, reduzindo custos com insumos e facilitando o manejo agrônomo. Assim, ostenta alto potencial para ser comercializada e consumida em populações rurais, contribuindo para melhorar as condições de vida da região. Como resultado, esta planta vem adquirindo grande importância, sendo cultivada em várias regiões e países do mundo, incluindo América do Sul, África, Índia, China e Estados Unidos (AGUILAR et al., 2013).

A indução da ampla gama de mecanismos de defesa descritos acima envolve maciça redistribuição energética. Em conjunto, a alocação de grandes fluxos de carbono ao metabolismo secundário durante a resposta de defesa não pode ocorrer sem influenciar reações no metabolismo primário (BOLTON, 2009). O dilema desta divisão "crescimento x defesa" ganhou grande interesse na ecofisiologia das plantas, sendo atualmente discutido, pois muitas questões ainda não foram completamente elucidadas (AGRAWAL, 2000; HERMS; MATTSON, 2001; CIPOLLINI, 2004; IZAGUIRRE et al., 2006; BALLARÉ, 2009; LEONE et al., 2014).

As razões responsáveis pelos diversos efeitos estimulantes dos elicitores são complexos e podem ser relacionados às suas interações com as células vegetais, transduções de sinais e respostas de defesa da planta. O conhecimento básico dos mecanismos de elicitação a nível bioquímico, genético e molecular será útil para manipular vias metabólicas secundárias, para desenvolver alimentos de qualidade e produtos farmacêuticos para aplicações práticas (BAENAS et al., 2014). No Brasil, a espécie *Amaranthus cruentus*, cultivar BRS Alegria, é a primeira recomendada para plantio (SPEHAR et al., 2003) e, apesar da importância conferida, são escassas as pesquisas referentes ao seu comportamento frente à elicitação. Neste contexto, tornam-se imprescindíveis estudos que objetivem a investigação do comportamento fisiológico de espécies medicinais frente à aplicação de elicitores. Por isso, o

objetivo do presente estudo foi caracterizar as respostas fisiológicas e bioquímicas de plantas de amaranto na presença dos elicitores metil jasmonato e ácido salicílico, nos métodos de cultivo: *in vitro* e hidropônico.

1 CAPÍTULO I - **Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Amaranthus cruentus* L., cv. BRS Alegria**

1.1 Introdução

Os produtos alimentares funcionais vêm sendo altamente solicitados no mercado global (KRAUS, 2015), em função do interesse do consumidor por dietas capazes de conferir benefícios à saúde (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2011). Neste contexto, a espécie *Amaranthus cruentus* L. conhecida como amaranto ou caruru, tornou-se foco de interesse, não só por seu alto valor nutricional, mas também devido às suas propriedades medicinais e nutracêuticas, chegando a ser considerada uma das novas culturas do milênio (RASTOGI; SHUKLA, 2013; VELARDE - SALCEDO et al., 2013).

Dentre os benefícios inerentes à espécie, cita-se o elevado conteúdo de fitosteróis (sitosterol, campesterol e stigmasterol), moléculas capazes de combater a hipercolesterolemia (PLATE; ARÊAS, 2002; MARCONE et al., 2003). Além de outros fitoquímicos, presentes em abundância, como compostos fenólicos, que possuem fortes propriedades antioxidantes, sendo associados à prevenção de doenças como câncer, arteriosclerose e diabetes (NEUDECK et al., 2012).

Por seu caráter medicinal, o amaranto é recomendado a gestantes, lactantes, pacientes com constipação, febre, hemorragia e anemia, podendo ainda auxiliar no aumento da imunidade de portadores do vírus HIV (QUINTON, 2006; MUTHAURA et al., 2007).

Grande parte destes componentes benéficos à saúde humana, proveniente dos alimentos de origem vegetal, deve-se ao metabolismo secundário das plantas (GAWLIK - DZIKI et al., 2013). Nos vegetais, estes compostos funcionam em defesa contra estresses bióticos ou abióticos ou em interações benéficas com outros organismos. E alguns desses produtos naturais,

já são usados por seres humanos como produtos farmacêuticos, cosméticos, perfumes e corantes (ZHOU et al., 2011).

Visando atender esta demanda, a técnica do cultivo *in vitro* vem sendo utilizada para a produção de compostos de interesse para as indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (SHIM et al., 2010). 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).

Para alcançar o sucesso da cultura *in vitro*, são necessários requisitos essenciais para o ótimo estabelecimento das plântulas, sendo fundamental a concentração de nutrientes no meio, devido a cada espécie apresentar comportamento diferenciado no seu desenvolvimento pertinente às características genéticas (KOZAI et al., 1997; PEREIRA et al., 1999).

Geralmente utiliza-se como meio nutritivo padrão o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), composto de macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos e fonte de carbono (SU et al., 2012). Além destes fatores, respostas positivas são alcançadas com um balanço adequado dos reguladores de crescimento, sendo os mais utilizados, as citocininas e as auxinas (XAVIER et al., 2009). As concentrações dos mesmos variam de acordo com o estágio de micropropagação e em função da espécie e do tipo de explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A cultivar BRS Alegria é a primeira recomendada para plantio no Brasil (SPEHAR et al., 2003) e, apesar da importância medicinal e nutracêutica, ainda não existem protocolos para seu cultivo *in vitro*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos de estabelecimento e multiplicação *in vitro* para a espécie *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, para que possam ser obtidas plantas com condições fitossanitárias adequadas para possível exploração dos seus compostos bioativos.

1.2 Material e métodos

Para a realização do experimento, sementes de amaranto foram dispostas em papel tipo “germitest”, previamente umedecido com água destilada, acondicionado em placas de petri, e levadas à câmara de germinação onde permaneceram por 48 horas em temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro. As plântulas

obtidas foram inoculadas nos meios de cultivo, em câmara de fluxo laminar em condições assépticas. Utilizou-se meio MS, com pH ajustado para 5,8, acrescido de 7 g L⁻¹ de ágar. Aproximadamente 40 mL dos meios foram colocados em frascos tipo erlenmeyer, vedados com algodão, e autoclavados por 20 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1,05 kg cm⁻². Os meios de cultivo testados para o estabelecimento foram: meio MS completo (MS), MS + 1 g L⁻¹ de carvão ativado (CA), meio MS 50% (MS 50%), MS 50% + 1 g L⁻¹ de CA.

Posteriormente, foram testados sistemas de vedação. Para este experimento, utilizou-se o meio de cultura com o melhor resultado no experimento anterior (MS 50%), que foi distribuído em frascos altos (tipo conserva) com capacidade para 300 mL, vedados com alumínio ou tampa plástica, e em erlenmeyers de 250 mL, vedados com alumínio ou algodão. As plantas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2°C, 16 horas de fotoperíodo e 48 μmol m⁻² s⁻¹ de densidade de fluxo de fótons, por 35 dias, sendo posteriormente avaliadas quanto a % de sobrevivência e de contaminação.

Em ambos os experimentos o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (meios de cultura e sistemas de vedação), sendo cada um composto de três repetições e a unidade experimental representada por três frascos contendo quatro explantes, totalizando 36 frascos/experimento.

Os dados foram submetidos à análise de variância (p≤0,05) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro por meio do Programa Estatístico WinStat 1.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007).

Para o experimento de multiplicação foram utilizados os seguintes tratamentos: MS 50% sem reguladores de crescimento (controle); MS 50% com 1,0 mg L⁻¹ de CIN; MS 50% com 1,0 mg L⁻¹ de CIN + 0,01 mg L⁻¹ de ANA; e MS 50% com 0,5 mg L⁻¹ de CIN + 0,01 mg L⁻¹ de ANA. Os explantes provenientes da fase de estabelecimento foram inoculados nos meios citados, permanecendo em sala de crescimento conforme descrito anteriormente. Após 35 dias, foram avaliados quanto à altura, número de gemas e brotos, massa fresca e seca de parte aérea, comprimento e massa seca de raízes.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos (composição do meio de cultivo), sendo cada um composto de três repetições, onde a unidade experimental foi representada por três frascos

contendo quatro explantes, totalizando 36 frascos. Os dados foram avaliados de acordo com metodologia já citada para os experimentos anteriores.

1.3 Resultados e discussão

A composição do meio de cultivo é essencial para o ótimo desempenho do explante, pois reúne os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, podendo ser formulado com diferentes combinações de acordo com a necessidade nutricional de cada espécie (VILLA et al., 2014). A maior porcentagem de sobrevivência e a menor de contaminação foram obtidas no meio de cultivo MS 50%, com taxas de 100% e 0%, respectivamente (Tabela 1).

Estes resultados podem ser corroborados por Monfort et al. (2012) os quais afirmam que a concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose favoreceu o desenvolvimento de plantas medicinais de *Ocimum selloi* Benth., cultivadas nesse tipo de meio in vitro. Contudo, não houve diferença estatística para a segunda variável analisada, pois todos os tratamentos apresentaram baixa contaminação, indicando assepsia e manipulação adequadas dos explantes. Segundo os autores supracitados, maiores concentrações de sacarose aumentam o efeito osmótico do meio de cultura, podendo prejudicar o desenvolvimento da plântula cultivada. Esta afirmação pode justificar o desempenho dos meios com maiores concentrações desse carboidrato na composição, MS, 13,88% e MS + CA, 16,66%, os quais exibiram médias menores para percentuais de sobrevivência.

Além disso, o meio MS é considerado um meio de cultura com altas concentrações de sais e, neste estudo, constatou-se que a diminuição da concentração favoreceu o crescimento das raízes. Frequentemente, o alongamento radicular é inibido por NH₄⁺ e promovido por NO₃⁻ (MONFORT et al., 2015). Pode ter ocorrido maior relação de nitrato/amônio, em meio com menor concentração de nitrogênio, auxiliando no enraizamento, favorecendo o sucesso e a sobrevivência da plântula (MONFORT et al., 2015).

TABELA 1– Porcentagens de sobrevivência e contaminação observadas no estabelecimento *in vitro* de plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivados durante 35 dias em diferentes meios de cultura

Meios de cultivo	Sobrevivência %	Contaminação %
MS	13,88 c	2,77 a
MS + CA	16,66 c	5,55 a
MS 50%	100 a	0 a
MS 50% + CA	36,11b	2,77 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade de erro.

Os efeitos promotores do carvão ativado podem ser principalmente atribuídos a sua função de retenção de compostos tóxicos presentes no meio de cultura, como por exemplo, o 5–hidroximetil-furfural, produzido a partir da desidratação da sacarose durante a autoclavagem, substâncias inibitórias presentes no ágar ou também por reduzir a ação de outros metabólitos como fenóis, os quais são eliminados pelo explante. A presença de carvão ativado em plântulas de mandioca (*Manihot esculenta*) *in vitro* acarretou redução no crescimento, sugerindo competição deste componente com os sais do meio de cultura, tornando-o indisponível para serem absorvidos pelas raízes das plântulas (ROCA et al., 1984). Pode-se inferir, a partir dos resultados, que a dose utilizada afetou negativamente o crescimento dos explantes de amaranto, reduzindo significativamente a taxa de sobrevivência.

Para o experimento testando diferentes sistemas de vedações, a maior taxa de sobrevivência foi apresentada pelas plantas mantidas em erlenmeyer fechados com algodão, com média de 97,22%, sendo estatisticamente superior às demais (Tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagens de sobrevivência e contaminação observadas no estabelecimento *in vitro* de explantes de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivados durante 35 dias em diferentes frascos e vedações

Tipo de frasco e vedação	Sobrevivência (%)	Contaminação (%)
Erlenmeyer + algodão	97,22 a	0 a
Erlenmeyer + alumínio	69,44 b	0 a
Frasco + tampa plástica	25 c	0 a
Frasco + alumínio	27,77 c	0 a

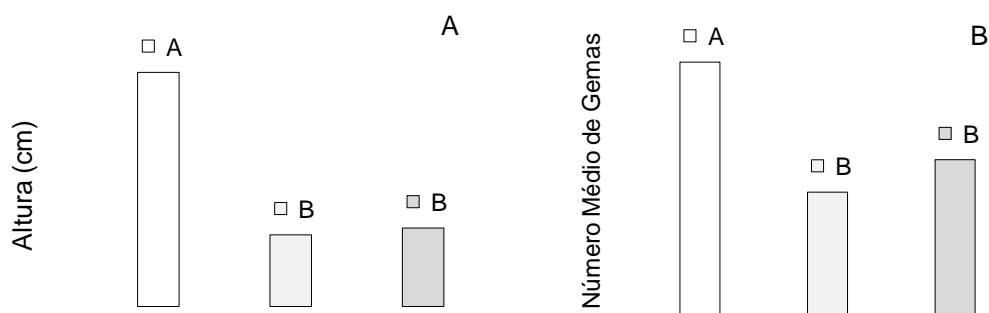
Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O sistema de vedação convencional, com tampa plástica, previne a desidratação de plantas e do meio de cultura, evitando também a contaminação. No entanto, neste sistema ocorre elevada concentração de etileno e redução de CO₂, restrição no fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e limitação de trocas gasosas, prejudicando as taxas de transpiração e a fotossíntese. Os processos de absorção de água e nutrientes são dificultados, acarretando em redução da taxa de crescimento dos explantes (ZOBAYED et al., 2002; KOZAI et al., 2005; XIAO et al., 2011).

Provavelmente, ocorreram estes distúrbios nos outros sistemas testados, pois neles as vedações empregadas possuem menor porosidade quando comparados ao algodão. O desempenho superior dos erlenmeyers em relação aos frascos altos, pode ser explanado por Buffa Filho et al. (2002), os quais sugerem que recipientes menores favorecem a oxigenação e incorporação de CO₂.

É essencial que a praticidade de manuseio durante as fases da propagação seja considerada na escolha de um recipiente de cultivo. Desse modo, frascos de tamanho grande e médio apresentam-se pouco práticos, principalmente pela necessidade do uso de pinças longas para o manuseio das plântulas (NICOLOSO; ERIG, 2002). Não foram observadas contaminações neste experimento.

No experimento de multiplicação foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em todas as variáveis analisadas. O meio MS 50% apresentou os maiores valores para altura dos explantes, número médio de gemas, massa fresca e seca de parte aérea, comprimento e massa seca de raízes (Figura 1A a 1F).



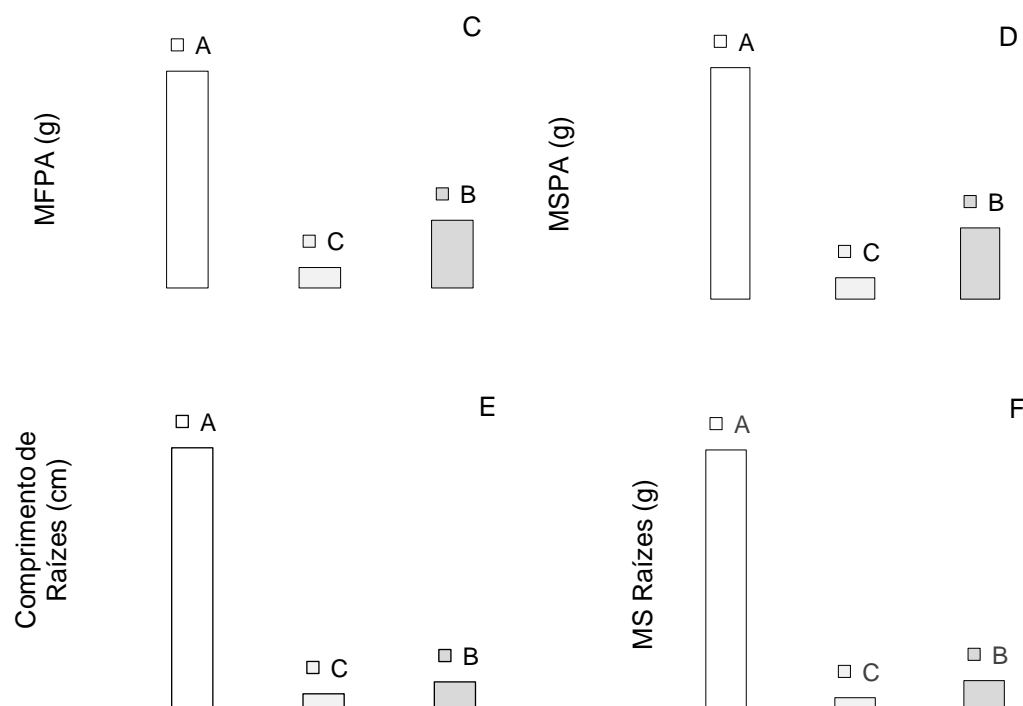


Figura 1- Altura (A), número médio de gemas (B), massa fresca de parte aérea (MFPA) (C), massa seca de parte aérea (MSPA) (D), comprimento de raízes (E) e massa seca de raízes (MS Raízes) (F) em plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas *in vitro*, por 35 dias, em meio de cultura com diferentes composições. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os resultados observados podem ser corroborados por Bandinelli et al. (2013), os quais afirmam que a redução da concentração de sais e sacarose do meio MS tem mostrado efeito sobre variáveis morfogênicas em plantas micropropagadas. Os explantes expostos ao tratamento $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de CIN + $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA não sobreviveram.

A altura das plantas é uma variável importante, pois está diretamente relacionada com o número de nós que serão recuperados em novas brotações (MOREIRA et al., 2003), consequentemente permitindo maior multiplicação. Dzazio et al. (2002), concluíram ser possível a multiplicação do porta-enxerto de videira '420'-A em meio MS 50%, isento de reguladores de crescimento, corroborando os resultados apresentados neste trabalho. Castro et al. (2003), estudando a multiplicação *in vitro* de *Limonium brasiliensis*, verificaram que os meios MS e MS 50%, sem a presença de reguladores de crescimento, para a variável número de brotações por explante, alcançaram valores médios de 2,3,

mostrando assim que a diferença de concentração de sais em até 50% pode ser útil à redução dos custos de produção comercial dessas mudas. De acordo com estudos realizados por Vieira et al. (2009), com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), o aumento nas concentrações dos reguladores de crescimento, no meio de cultura, não implica, necessariamente, no melhor desenvolvimento das brotações, havendo um limite sutil entre a indução e a inibição, o que é específico para cada espécie vegetal.

Para que ocorra a morfogênese in vitro é necessário que haja sinalização específica por reguladores de crescimento os quais agem de modo a alterar a fisiologia e morfologia da planta, o que pode ocasionar modificações qualitativas e quantitativas na produção (GUERRA; NODARI, 2006). A formação de órgãos depende do balanço entre citocinina e auxina (KERBAUY, 1997), sendo capaz de promover a formação de raízes, parte aérea ou calo.

Os explantes cultivados na presença de CIN ou ANA expressaram redução na massa fresca e seca de parte aérea, comprimento e massa seca de raízes quando comparadas ao controle. Estes resultados indicam desenvolvimento e funcionamento ineficientes do sistema radicular, prejudicando a absorção de nutrientes e sacarose, reduzindo a energia disponível para o crescimento da parte aérea, pois a massa seca permite inferir a respeito da incorporação de carbono e da qualidade da planta. Tal desempenho deve-se ao fato de auxinas serem variáveis que mais influenciam no enraizamento, e a adição de outros biorreguladores é desnecessária ou até prejudicial (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Quando a concentração de auxina no meio é excessiva, ocorre formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea (RADMANN et al., 2002). Conforme Rohr; Hanus (1987), as respostas às auxinas não são universais, pois certas espécies, nem mesmo em sua presença conseguem enraizar, enquanto outras dispensam o uso de hormônios enraizadores. Neste experimento o uso do meio MS completo prejudicou o crescimento da raiz. Isso sugere que altas concentrações do meio básico do MS podem ser tóxicas para o crescimento da raiz ou ainda causar efeito osmótico.

Isutsa (2004) não obteve diferença quanto a porcentagem de enraizamento in vitro de *Passiflora edulis*, ao utilizar 20 ou 30 g L⁻¹ de sacarose,

observando em ambas 100% de enraizamento. Segundo Monfort et al. (2015), a diferença da concentração de sais no meio básico é um fator importante na indução de raízes. Normalmente, alta concentração inibe e, baixa induz o enraizamento. Segundo Biasi et al. (1998) ao estudarem videiras (*Vitis vinifera*), verificaram que a concentração de 50% dos sais do MS maximizou o número de raízes por planta. Já para as cultivares MC e Adams de marmeleiro (*Cydonia oblonga*), o uso de 75% da concentração dos sais do MS proporcionou aumento na porcentagem de enraizamento, número e comprimento médios das raízes (ERIG et al., 2004). Para cultivares de morangueiro, Pereira et al. (1999) constataram ser a redução da concentração dos sais favorável ao enraizamento e à formação de raízes.



Figura 2- Número médio de brotos em plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas *in vitro*, por 35 dias, em meio de cultura com diferentes composições. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Segundo Torres et al. (1998), o uso de citocininas estimula maior produção de parte aérea através do aumento da massa fresca, número de gemas e folhas. Grattapaglia e Machado (1998) ressaltaram ser a cinetina muito eficaz em promover a multiplicação de plantas, sendo uma das principais citocininas utilizadas no cultivo *in vitro* para melhorar a micropropagação, com aumento no número de gemas, folhas e brotos, induzindo acréscimo na produção de massa fresca e qualidade das plantas cultivadas. Entretanto, isto não foi observado no presente trabalho, pois as menores médias para massa fresca e seca de parte aérea, foram apresentadas pelas plantas tratadas com 1 mg L⁻¹ de CIN, com os valores de 0,051 g, 0,012 g, respectivamente. Ainda, de

acordo com o mesmo autor, a utilização de concentrações mais elevadas, acima da ótima para a multiplicação da espécie em estudo pode inibir o desenvolvimento dos referidos órgãos. Além disto, este tratamento obteve as médias mínimas para comprimento e massa seca de raízes, com 1,38 cm e 0,076 g. Todavia, este regulador de crescimento promoveu o maior número médio de brotos, com média de 2,11, diferindo estatisticamente dos demais ($p < 0,05$) (Figura 2). Tais resultados sugerem realocação de energia para brotações em detrimento dos crescimentos de parte aérea e radicular.

1.4 Conclusões

O meio MS 50% sem adição de reguladores de crescimento e o uso de erlenmeyer com vedação de algodão, são os mais indicados para estabelecimento e multiplicação *in vitro* da espécie *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, pois neste as plantas conseguem obter maior taxa de sobrevivência e desenvolver melhor suas brotações e raiz, permitindo maior percentual de explantes para serem utilizados na micropropagação.

2 CAPÍTULO II - Incremento de moléculas bioativas através do uso de reguladores de crescimento em plantas de *Amaranthus cruentus* L., cultivadas *in vitro*

2.1 Introdução

Espécies de amaranto (*Amaranthus* spp.) ganharam grande destaque nos últimos anos por constituírem fonte não convencional de proteínas, com alta biodisponibilidade e equilibrada composição de aminoácidos (ALVAREZ - JUBETE et al., 2010). São referidas como pseudocereais porque, apesar de não pertencerem à família das gramíneas como os cereais tradicionais, possuem sementes ricas em amido, as quais podem ser empregadas na fabricação de farinhas (BRADY et al., 2007). Adicionalmente é isento de glúten, representando avanço significativo no sentido de garantir ingestão adequada de nutrientes em indivíduos com doença celíaca (VENSKUTONIS; KRAUJALIS, 2013).

Além de constituir rica fonte de nutrientes, o amaranto apresenta ampla variedade de fitoquímicos bioativos como polifenóis, terpenoides, taninos, esteroides e betalaínas (PAŠKO et al., 2008; NANA et al., 2012; NEUGART et

al., 2017). Estes últimos são pigmentos solúveis em água, encontrados em limitado número de famílias da ordem Caryophyllales (GEORGIEV et al., 2008). Podem ser divididos em dois grupos: as betacianinas e betaxantinas, com as colorações violeta e amarela, respectivamente (GANDÍA-HERRERO; GARCÍA-CARMONA, 2013). Exibem vasta gama de atividades biológicas desejáveis, incluindo antioxidantes, anti-inflamatórios, hepatoprotetores e propriedades anticancerígenas, sendo empregados também, como corantes alimentícios (GEORGIEV et al., 2008). Alimentos coloridos atraem muito interesse, uma vez que afetam consideravelmente a sua aceitabilidade. Estes produtos aumentam o desejo dos consumidores pela estética, aspectos nutricionais e segurança dos alimentos, o que elevou a demanda por pigmentos naturais, como betalaínas (CAI et al., 2003).

Os flavonoides, também presentes em espécies de amaranto, exercem inúmeras funções nos vegetais, protegendo-os da ação de agentes abióticos e bióticos, sendo essenciais contra a incidência de raios ultravioleta e ataques de insetos e patógenos, além de participarem da conformação estrutural da parede celular das plantas (OSORIO-ESQUIVEL et al., 2011). Entretanto, são os seus benefícios para a saúde humana que despertam atenção especial, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias já estabelecidas (VERARDO et al., 2010).

Grande parte dos componentes benéficos à saúde humana, proveniente dos alimentos de origem vegetal, deve-se ao metabolismo secundário das plantas (GAWLIK-DZIKI, 2013). Tais moléculas são usadas como produtos farmacêuticos, cosméticos, perfumes, corantes ou saborizantes (ZHOU et al., 2011). A produção destes metabólitos é muito baixa (menos de 1% de peso seco) e depende principalmente da fase fisiológica e de desenvolvimento da planta (DIXON, 2001; OKSMAN-CALDENTY; INZE, 2004). Várias estratégias biotecnológicas têm sido aplicadas para aumentar a produtividade e a elicitação é reconhecida como a técnica mais viável para a obtenção de compostos desejáveis em tecidos vegetais (POULEV et al., 2003; ANGELOVA et al., 2006; NAMDEO, 2007).

Os elicitores empregados, os quais podem ser físicos e/ou químicos, ao entrarem em contato com as plantas desencadeiam estresse celular (ZHAO; VERPOORTE, 2007), afetando qualitativamente e/ou quantitativamente a

síntese de moléculas bioativas (SIRCAR; MITRA, 2009) tais como, os pigmentos betalâmicos, flavonoides e outros (GEORGIEV et al., 2008). A adição exógena de elicitores é conhecida não somente por melhorar a produção de metabólitos alvo, mas também por levar à síntese de novas substâncias (NARAYANI; SRIVASTAVA, 2017).

Vários tipos de elementos são envolvidos na sinalização de estresse e resposta em células vegetais. Fito-hormônios como metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), são conhecidos por agirem como elicitores para a produção de metabólitos secundários em diversas espécies (PÉREZ - TORTOSA et al., 2012; RODRIGUES - BRANDÃO et al., 2014). Estes se acumulam rapidamente em plantas atacadas por agentes estressores, resultando em aumento da expressão de mecanismos defensivos. Ambos foram dois dos mais recentemente estudados para estimular a síntese de substâncias em células cultivadas (MEIER et al., 2015; BORODUSKE et al., 2016; CAI et al., 2017).

A cultura de tecidos vegetais surge como ferramenta biotecnológica viável para a produção de compostos bioativos (KARUPPUSAMY, 2009), sendo muito bem reconhecida e cada vez mais utilizada para fins industriais (GEORGIEV et al., 2009; STEINGROEWER et al., 2013). As vantagens dessa técnica compreendem a facilidade de manipulação de um ou mais fatores de experimentação, propiciando maior compreensão dos intrincados mecanismos envolvidos na síntese de metabólitos secundários (NARAYANI; SRIVASTAVA, 2017).

Apesar da valiosa importância medicinal e nutracêutica das plantas de amaranto, ainda são escassos os estudos referentes às suas respostas frente à elicitação, especialmente em condições de cultivo *in vitro*. No Brasil, o cultivar BRS Alegria da espécie *Amaranthus cruentus* foi desenvolvida com o propósito de atender à crescente demanda, considerando os benefícios à saúde bem como o alto valor agregado aos seus produtos funcionais (SPEHAR et al., 2003).

A partir do contexto exposto, o principal objetivo do trabalho foi analisar a capacidade elicitora do MeJa e As para incrementar a produção de metabólitos bioativos e o ajustamento osmótico em plantas de *A. cruentus*, cultivadas *in vitro*.

2.2 Material e métodos

Foram utilizadas plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, pertencentes ao Banco de Plantas in vitro do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Pelotas, Brasil. As plantas foram micropropagadas conforme protocolo descrito por Espinel et al. (2017) em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sem regulador de crescimento, com 15 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 100 mg L⁻¹ de inositol, mantidas em câmara de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 h de fotoperíodo e temperatura de 25°C \pm 2, por 30 dias. Posteriormente, os elicitores MeJa e AS foram adicionados ao meio de cultivo na concentração de 100 μM , além do tratamento controle, isento dos mesmos. As plantas foram coletadas para avaliação após 24, 48, 72 e 96 horas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4 (elicitores x períodos de coleta), totalizando 12 tratamentos, compostos por três repetições, sendo cada unidade experimental representada por um frasco contendo três plantas de *A. cruentus*.

A concentração de flavonoides totais foi determinada em 125 mg de massa fresca da parte aérea, sendo o tampão extrator acetato/metanol (70/30 %, v/v). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, em 330 nm e os resultados expressos em μmol de quercetina por grama de massa fresca.

Para a extração de amarantina, tecidos foliares foram macerados em almofariz com tampão fosfato 10 mM, pH 6,0, acrescido de ascorbato de sódio na mesma concentração. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 20 minutos, a 4°C, de acordo com Reis et al. (2017). A concentração de amarantina foi determinada levando-se em consideração o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 56600 \text{ M cm}^{-1}$, em comprimento de onda de 536 nm. O resultado foi expresso em mg de amarantina por 100 gramas de massa fresca.

A extração da betanidina e betanina foi realizada com dois tipos diferentes de tampão extrator. Para betanidina, tampão acetato de sódio 10 mM e metanol (70/30%), além de ascorbato de sódio 10 mM (pH 5,0). Para betanina, tampão fosfato de potássio 10 mM, acrescido de ascorbato de sódio 10 mM (pH 6,0), sem adição de solvente orgânico. Para as duas análises foram utilizadas 125 mg

de massa fresca, maceradas em almofariz e o extrato centrifugado a 10.000 g, por 20 minutos a 4°C como descrito por Gandía-Herrero et al. (2005). O coeficiente de extinção molar utilizada para o cálculo de betanidina foi de $\epsilon = 54000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e para betanina de $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em comprimento de onda de 536 nm. Os resultados foram expressos em mg de betanidina em 100 g de massa fresca e mg de betanina em 100 g de massa fresca. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS modelo Ultrospec 7000 - GE Healthcare.

As betaxantinas seguiram protocolo descrito Reis et al. (2017), com a mesma metodologia anteriormente descrita para betaninas. A concentração de betaxantina foi dada através do coeficiente de extinção molar para miraxantina $\epsilon = 48000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em comprimento de onda de 480 nm e o resultado, expresso em mg de miraxantina por 100 gramas de massa fresca.

A quantificação do aminoácido prolina seguiu metodologia proposta por Bates et al. (1973), com adaptações, a partir da maceração de 200 mg de tecido foliar com adição de 2 mL de ácido sulfossalicílico a 3%. O extrato obtido foi centrifugado por 10 minutos a 13.000g. Após, 1,0 mL do sobrenadante de cada amostra recebeu 2 mL de ninhidrina ácida, 2 mL de ácido acético glacial e 2 mL de água destilada e cada uma foi levada ao banho-maria a 100°C, onde permaneceram por 1 hora. Em seguida, os tubos foram resfriados e, 4 mL de tolueno foram adicionados a cada amostra, sendo elas agitadas vigorosamente por 20 segundos, para a separação das fases. O sobrenadante foi aspirado da fase aquosa, e a leitura procedida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 520 nm com os valores obtidos expressos em mmol prolina g⁻¹ MF.

A glicina betaína (GB) foi avaliada de acordo com Grieve; Grattan (1983), com adaptações. Os extratos foram preparados com adição de 1 mL de água deionizada para 0,25 g de amostras de folhas moídas, sendo agitados durante 24 horas a 25°C. Posteriormente, foram filtrados e armazenados a -17°C até a realização das análises. Os extratos foram descongelados e misturados na proporção de 1:1 com H₂SO₄ 2N sendo em seguida mantidos em água gelada durante 1 hora. Posteriormente a reação recebeu 0,2 mL de KI-I₂, permanecendo a 4°C durante 16 horas, com subsequente centrifugação a 11.872g por 15 minutos à 0°C. O sobrenadante foi descartado, permanecendo os cristais de periodato formados, os quais foram dissolvidos em 0,9 mL de 1,2-dicloroetano. Após 2 horas e 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância no comprimento

de onda de 365nm no espectrofotômetro. A expressão dos resultados ocorreu em mmol GB g⁻¹ MF.

O potencial osmótico foi determinado com auxílio de osmômetro de pressão de vapor modelo 5600 VAPRO (Wescor, Logan, Utah, EUA). Para isso, amostras foliares de aproximadamente 700 mg foram maceradas em tubos de polipropileno, com capacidade para 2 mL, com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, o extrato obtido foi centrifugado a 12.000g, a temperatura de 4°C durante 20 minutos. Utilizou-se alíquota de 10 µL para realização das leituras. Para conversão dos valores de mmol kg⁻¹ a potencial osmótico (Ψ_s), utilizou-se a equação de Van't Hoff em que $\Psi_s = -C \times 2,58 \times 10^{-3}$, na qual C é o valor de osmolalidade.

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$), as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro por meio do Programa Estatístico R Studio e, em caso de interação significativa entre os fatores, as variáveis Y_{ijk} originais foram padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral de forma a manter sempre valores positivos, conforme equação abaixo:

$$Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$$

As pressuposições da ANOVA foram testadas:

- a) modelo aditivo
- b) independência dos erros (Σ_{ijk})
- c) normalidade dos erros (Σ_{ijk})
- d) variância dos erros homogêneos

Assim,

$$Y_{ijk} = u + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \Sigma_{ijk}$$

Y_{ijk} representa o valor da variável;

i, o índice do fator tempo;

j, o índice do fator tratamento;

k, o índice do número de repetições;

u, a média geral;

α_i , efeito do tempo i;

β_j , o efeito do tratamento j;

$(\alpha\beta)_{ij}$, o efeito da interação tempo por tratamento ij;

Σ_{ijk} , resíduo do modelo A.

Para verificar a correlação existente entre os parâmetros analisados, foi obtido o grau de associação, efetuando-se a matriz de coeficiente de correlação (r) de Pearson, pelo teste t a 5% e 1% de probabilidade.

2.3 Resultados e discussão

A ingestão de alimentos ricos em flavonoides, como o amarantho, é importante do ponto de vista dietético e medicinal, pois estes compostos são capazes de prevenir inúmeras doenças como aterosclerose e diversos tipos de câncer (KALINOVA; DADAKOVA, 2008). Com o objetivo de verificar se os elicitores incrementaram o teor de flavonoides durante o cultivo in vitro foram testados o MeJa e AS, na concentração de 100 μM . Foi observado que o tempo de exposição aos elicitores, não modificou o teor dos flavonoides, porém a presença dos elicitores promoveu um incremento deste metabólito (Figura 1). As médias obtidas para os tratamentos com ambos elicitores foram superiores ao controle, com médias de 33,26 e 40,07 μmol quercetina g^{-1} MF para MeJa e AS, respectivamente. Os incrementos observados foram de 1,90 e 2,29 vezes maiores em relação ao tratamento ausente de elicitores. O MeJa exibe forte influência na regulação do metabolismo secundário, estimulando o acúmulo de alcaloides, fenóis, cumarinas e flavonoides (YAN et al., 2013). Contudo, para esta variável em *A. cruentus*, o referido fito-hormônio não apresentou resultado tão acentuado quanto o AS, o qual alcançou a maior média. Incrementos no teor de flavonoides também foram observados por Wang et al. (2015) ao investigarem o efeito de ambos elicitores em *Hypericum perforatum*. Porém, ao contrário do observado no presente trabalho, naquela espécie o MeJa foi o responsável pelos maiores resultados. Estes comportamentos evidenciam que as respostas ao elicitador estão intimamente relacionadas à espécie.

As plantas sintetizam ácido salicílico (AS) a partir do ácido cinâmico, e este processo tem os mesmos produtos intermediários que a biossíntese de rutina, um tipo de flavonoide. Dessa forma, o AS pode desempenhar papel como fator sinalizador na rota biossintética do referido composto, estimulando assim a síntese flavonoídica (SUN et al., 2012). Assim, nossos resultados indicam o

potencial uso do AS como elicitor em *A. cruentus* para obtenção de elevados teores dessas moléculas.

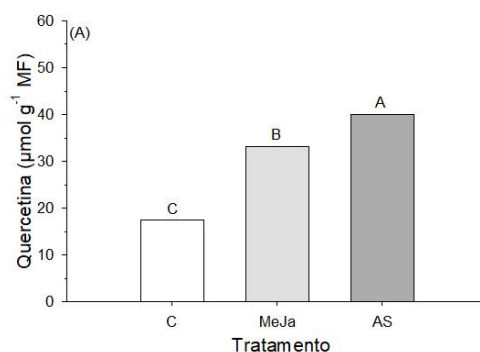


Figura 1. Teor de flavonoides em plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, submetidas ao metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS) no cultivo in vitro. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

Para a variável amarantina, não foi observada interação significativa entre os fatores (Figura 2). Para o fator tempo de exposição ao elicitor, foi observada tendência linear crescente, com os maiores valores obtidos às 96 horas após a aplicação dos elicitores.

O sucesso e a eficiência da elicitação dependem da linha celular, tipo, especificidade e concentração dos elicitores, metabólito secundário de interesse e outras condições incluindo composição do meio, tempo de contato e exposição durante o ciclo de crescimento (WANG et al., 2001; CHONG et al., 2005; VASCONSUELO; BOLAND, 2007). As respostas verificadas indicam que em *A. cruentus*, o período de exposição é essencial ao acúmulo de amarantina em seus tecidos e, possivelmente, a concentração obtida seria significativamente maior caso as plantas tivessem sido avaliadas em períodos posteriores aos realizados neste trabalho.

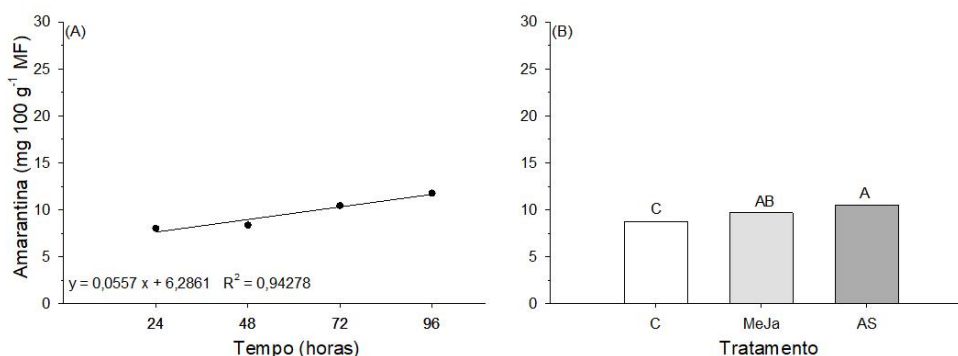


Figura 2. Teor de amarantina em plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em in vitro (A) e na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS) (B). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

Nas plantas da ordem *Caryophyllales*, a exemplo da espécie em estudo, alguns flavonoides como as antocianinas, podem ser substituídos pelas betalaínas. Além disso, como sugerem Rodrigues-Brandão et al. (2014), ao estudarem o comportamento de *Alternanthera tenella*, também da família *Amaranthaceae*, o aumento do período de exposição ao elicitor pode ser desfavorável para a elevação do conteúdo de flavonoides e benéfico para a formação de betacianina. Pode ter ocorrido, especialmente nos dois primeiros tempos de avaliação, rota preferencial para o composto anteriormente discutido, a partir da tirosina, precursor comum entre ambos.

Em relação aos elicitores, ambos atuaram como indutores positivos na biossíntese de amarantina, com destaque para o AS o qual apresentou a maior média (10,48 mg de amarantina 100 g⁻¹ MF). Rodrigues - Brandão et al. (2014) observaram respostas similares ao investigarem os efeitos do referido fito-hormônio sobre este pigmento em *A. tenella*, com média de 14,6 mg de amarantina 100 g⁻¹ MF. Contudo, a dose empregada naquele trabalho foi quatro vezes superior à testada no presente estudo, indicando ser o *A. cruentus* mais suscetível ao acúmulo de amarantina, mesmo com doses menores de AS. Essas respostas demonstram a eficiência da espécie em sintetizar compostos de interesse bioativo, denotando potencial uso para exploração comercial.

A amarantina também teve sua síntese aumentada nas plantas tratadas com MeJa e estes resultados podem ser corroborados por Perotti et al. (2016) ao estudarem o efeito deste elicitor sobre o comportamento desta variável em *A. philoxeroides*. Em ambos os trabalhos, a concentração utilizada foi a mesma, contudo, naquela espécie, apesar da obtenção dos efeitos desejados sobre o incremento na produção de metabólitos alvo, ocorreram também efeitos tóxicos sobre as plantas, inviabilizando a continuidade do trabalho por tempo prolongado. A escolha da molécula a ser utilizada como indutora constitui fator primordial no processo de elicitação, especialmente quando o procedimento é

realizado in vitro. Considerando-se o espaço delimitado para o crescimento e desenvolvimento, pode ocorrer intensificação dos efeitos deletérios sobre os explantes.

As plantas são predominantemente caracterizadas pela presença de clorofilas, cruciais para a atividade fotossintética. No entanto, outros pigmentos, como antocianinas e betalaínas (betacianinas e betaxantinas), são importantes na criação de matizes contrastantes para a atração de animais, tanto para polinização como para dispersão de sementes, possuindo ainda, emprego como corantes em variados produtos (KLEIN et al., 2018).

As betacianinas englobam diversos pigmentos como isobetanina, neobetanina, isobetanidina, betanidina e betanina. Dentre elas, as duas últimas destacam-se por apresentarem maior atividade antioxidante (KLEWICKA et al., 2012). As betaxantinas também apresentam elevada capacidade de coloração, solubilidade em água e características bioativas, porém, são raramente usadas como potenciais corantes naturais em alimentos, devido à oferta limitada (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2018). Portanto, sua obtenção por meio de elicitores viabilizaria o emprego comercial.

Em relação aos pigmentos betanidina, betanina e miraxantina (Figura 3A, 3B e 3C), apenas as plantas tratadas com AS obtiveram médias acima do controle e somente no período de 24 horas. Kim et al. (2011) constataram que no tratamento de raízes de *Bupleurum falcatum* com 5 e 20 μM de MeJa por 24 e 96 horas, não houve expressão significativa dos genes responsáveis pela biossíntese de triterpenos e fitoesterol. Possivelmente, o mesmo ocorreu neste experimento, e, com maior período de elicitação, ocorreria intensa ativação da expressão gênica e consequente síntese dos referidos pigmentos. Bhuiyan; Adachi (2003) obtiveram sucesso na indução de betacianinas com dose de 0,1 μM de MeJa, entretanto, a aplicação de 100 μM promoveu redução nos valores, com a exibição de resultados inferiores ao tratamento controle.

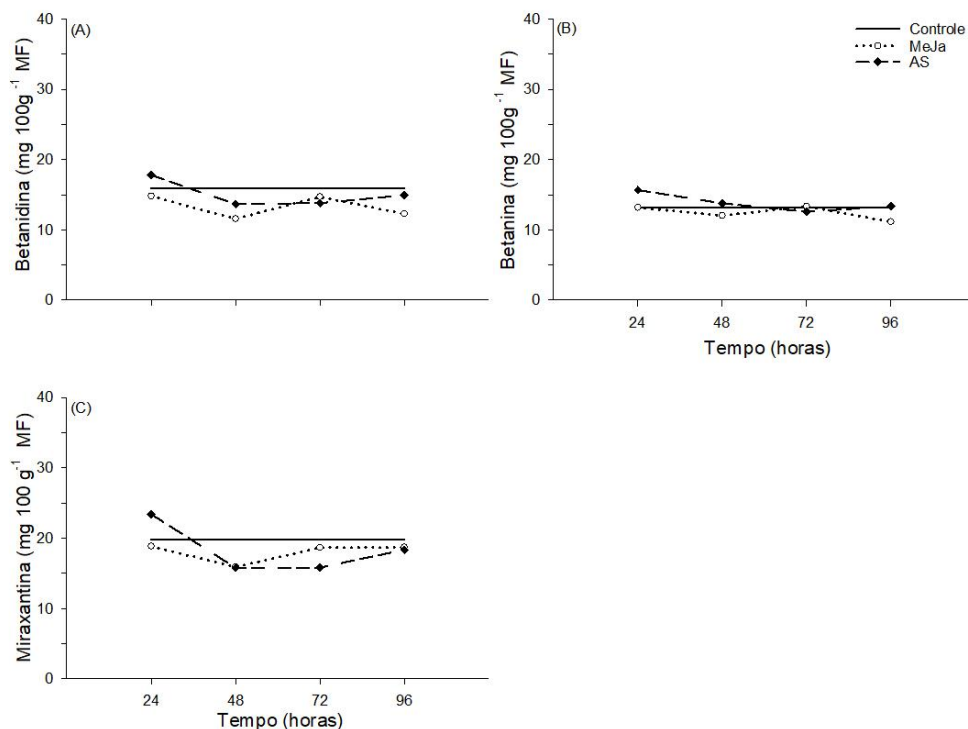


Figura 3. Teores de betanidina (A), betanina (B) e miraxantina (C) em plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo in vitro na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

A aplicação exógena de AS em concentrações não tóxicas tem se mostrado eficaz em processos regulatórios, tais como melhoria da produtividade e qualidade (ELWAN; EL-HAMAHMY, 2009), germinação de sementes (LOÏC et al., 2006), absorção de nutrientes e crescimento vegetativo (SHAKIROVA; SAKHABUTDINOVA, 2003) e síntese protéica (HAO et al., 2012). Além disso, tem sido envolvido na indução de metabólitos secundários como polifenóis, alcaloides, quininos, terpenoides e polipeptídeos (NADEEM et al., 2012, MASIDUR et al., 2012). Tamanho envolvimento em inúmeros processos faz com que o fito-hormônio tenha papel tanto de promoção quanto de inibição, dependendo da sua concentração, espécie, estágio de desenvolvimento e condições de cultivo (SENARATNA et al., 2000).

É possível afirmar que, neste trabalho, o AS inibiu a formação dos pigmentos referenciados pós 24 horas.

A escolha das doses dos elicitores foi realizada com base em estudos anteriores os quais indicam ser a concentração de 100 µM potencializadora de

rotas do metabolismo secundário, como observado por Cao et al. (2012). A concentração de 100 μ M de MeJa é a mais utilizada para induzir a produção de metabólitos alvo, porém, como citado anteriormente e, segundo Chee et al. (2015), a resposta em relação a esta concentração varia conforme o órgão exposto, bem como o tempo.

Na via biossintética das betalaínas, o ácido betalâmico é um intermediário, que condensa com Cyclo-DOPA e dopamina ou seus derivados para formar vários pigmentos. As betacianinas são formadas pela condensação de ácidos betalâmicos com Cyclo-DOPA ou seus derivados. Por outro lado, betaxantinas são formadas quando o ácido betalâmico se condensa com a dopamina ou seus derivados (SCHLIEMANN et al., 2001). Assim, parece que a atividade relativa das enzimas envolvidas na síntese de pigmentos estabelece o equilíbrio, determinando a proporção de vários pigmentos acumulados nas células. Como observado anteriormente no presente trabalho, ocorreu estímulo na formação de amarantina, um tipo de betacianina. Assim, pode ser possível que os elicitores empregados, de alguma forma, impediram a condensação do ácido betalâmico com a dopamina e seus derivados, reduzindo os níveis de betaxantinas, favorecendo o de betacianinas.

Outro importante fator a ser observado é a possível redução na síntese de intermediários, como a dopamina. Moghadam et al. (2014) estudando o efeito de ambos eliciadores sobre o referido composto em *P. oleraceae*, caracterizaram como ótima a concentração de 100 μ M de MeJa na indução da molécula. Valores acima deste ocasionaram inviabilidade celular, sendo, portanto, fitotóxicos. Para o AS, não ocorreram diferenças em relação ao controle. Neste sentido, é presumível que em plantas de *A. cruentus* os elicitores tenham inibido a síntese de dopamina, impedindo a formação de miraxantina.

Também é importante salientar que nesse trabalho as plantas de *A. cruentus* analisadas foram cultivadas in vitro e, segundo Udomsuk et al. (2011), pode ocorrer instabilidade no acúmulo dos metabólitos secundários nessas plantas micropropagadas por sofrerem algum tipo de estresse e dessa maneira, modificar a capacidade e/ou o padrão de produção dos compostos naturais. Além disso, metabólitos secundários com propriedades antioxidantes são muito sensíveis às condições do ambiente (GAUTIER et al., 2008).

Os elicitores podem desencadear complexas redes de respostas nos âmbitos molecular, bioquímico e fisiológico, visando aclimatização e adaptação ao meio ambiente (GIRI; ZAHEER, 2016). Além disso, o tipo de elicitor usado pode ativar diferentes vias que aumentam o conteúdo fitoquímico. Como citado anteriormente, o tempo de aplicação de cada elicitor pode alterar a força da resposta e, portanto, influenciar o resultado final do conteúdo de metabólitos alvo.

Estes resultados implicam que a acumulação preferencial ou o aumento de metabólitos secundários deve ser feito por criteriosa seleção do elicitor bem como do estágio fisiológico da cultura vegetal estudada (NARAYANI; SRIVASTAVA, 2017).

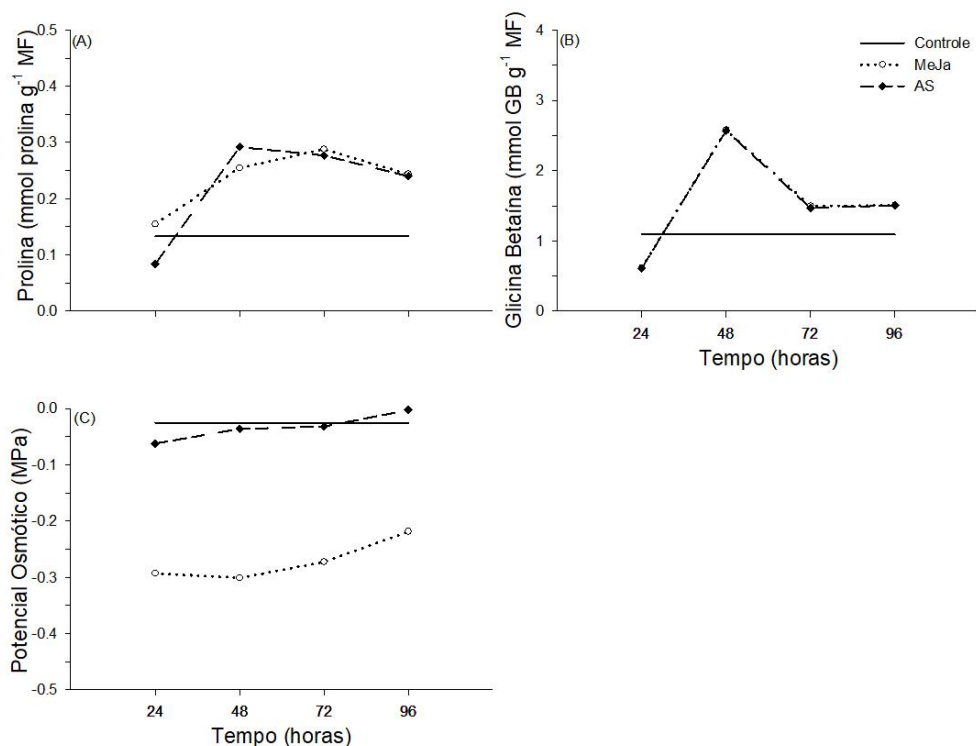


Figura 4. Teores de prolina (A), glicina betaína (B) e potencial osmótico (C) em plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em in vitro na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

Solutos orgânicos compatíveis são metabólitos que, quando acumulados no citosol, não interferem nas reações bioquímicas celulares (BENDALY et al.,

2016), protegendo ainda enzimas, estruturas subcelulares, membranas biológicas e proteínas (SLAMA et al., 2015). Para o aminoácido prolina (Figura 4A), foi observada interação entre os fatores analisados. As plantas expostas ao MeJa apresentaram ativação mais rápida da rota biossintética da molécula, com aumento gradual na concentração, chegando ao seu máximo às 72 horas. Posteriormente ocorreu declínio em seu conteúdo.

Apesar do atraso no início da síntese, o tratamento AS apresentou intensa resposta, com a obtenção da maior média geral nas primeiras 48 horas de avaliação. Assim como no tratamento anterior, este elicitor também exibiu declínio nas concentrações do osmólito, decaindo até o final do período. Os resultados obtidos podem ser corroborados por Misra; Saxena (2009) ao estudarem a elicitação em *Lens esculenta* com o referido elicitor. Nazarli et al. (2014) também encontraram respostas semelhantes ao avaliarem os efeitos dos elicitores MeJa e AS sobre plantas *Matricaria chamomilla* L.

Em relação à glicina betaína (Figura 4B), a elicitação também promoveu elevada semelhança entre seus efeitos nas plantas tratadas. Tanto o MeJa quanto o AS demonstraram os mesmos picos na concentração do osmólito no período de 48 horas, com posterior queda nos teores e estabilização, respectivamente, nos dois últimos momentos de avaliação, aparecendo sobrepostos no gráfico. A glicina betaína é considerada um dos osmólitos mais eficientes conhecidos nas plantas (CAYLEY; RECORD, 2003; KHAN et al., 2009).

De maneira geral, ambos elicitores apresentaram comportamentos extremamente similares no que tange os osmólitos estudados. Tal resultado evidencia a capacidade das plantas de *A. cruentus* reagirem a situações de estresse, buscando estabilizar o normal funcionamento do metabolismo através do ajuste osmótico. Essa estratégia promove redução do potencial osmótico pelo aumento líquido de solutos intracelulares, sendo mecanismo adaptativo de muitas culturas a diversos tipos de perturbações ambientais. Pode ser obtido pela síntese de novo de solutos compatíveis, como osmólitos orgânicos, ou pelo acúmulo de íons inorgânicos (ADOLF et al., 2012).

Apesar da alta semelhança na síntese dos osmólitos investigados no presente trabalho, houve disparidades nos resultados relativos ao potencial osmótico. A glicina betaína não possui, exclusivamente, a função osmoprotetora

nas células, pois esta molécula pode ser sintetizada a partir da colina ou precursores para ser utilizada, em vias metabólicas, formar compostos ligados à síntese do hormônio etileno e da molécula piruvato, além de ser fonte de carbono, nitrogênio e energia (MUNÔZ-CLARES; VELASCO-GARCIA, 2004). É possível que nas plantas tratadas com AS, essa molécula tenha apresentado maior instabilidade, com rápidos processos de síntese e posterior transformação em outros compostos mais urgentes no metabolismo, o que explicaria sua baixa contribuição na manutenção do potencial osmótico.

A variável potencial osmótico também exibiu interação significativa entre os fatores (Figura 4C), com o elicitor MeJa apresentando as menores médias em todos os períodos avaliados, corroborando a supracitada tentativa de ajuste osmótico às condições impostas. Em relação ao AS, este diferiu do controle somente nos períodos de 24 e 72 horas.

As respostas obtidas denotam que, em *A. cruentus*, há preferência na síntese de glicina betaína em detrimento à prolina. No tratamento com MeJa, onde o potencial osmótico foi mais negativo, possivelmente essa molécula foi majoritariamente responsável pela obtenção destes resultados. Dados apresentados por Gao et al. (2004) corroboram as respostas observadas, e indicam que o ácido jasmônico é capaz de provocar o acúmulo de glicina betaína independentemente da presença de estresse hídrico. Os mesmos autores comprovaram que este incremento foi acompanhado por ascensão na atividade e nos precursores da enzima betaína aldeído desidrogenase (BADH), indicando que ocorre regulação positiva através da expressão de genes relacionados à BADH. Nas plantas, o ácido jasmônico é modificado em diferentes formas ativas incluindo metil jasmonato (STASWICK; TIRYAKI, 2004; WANG; JIANG, 2007; WOLDERMARIAM et al., 2012).

O AS é capaz de promover a síntese de glicina betaína, especialmente sob situação de estresse ambiental, como salinidade, seca e frio (JAGENDORF; TAKABE, 2001). Esse aumento mediado por AS pode melhorar o crescimento geral da planta (MISRA; MISRA, 2012) e funciona como ativação da resistência sistêmica adquirida.

Este elicitor está igualmente envolvido no aumento do metabolismo de prolina, principalmente sob condições abióticas desfavoráveis (MISRA; SAXENA, 2009; KHAN et al., 2013). Tal incremento está diretamente ligado à

ativação das enzimas biossintéticas, a exemplo da pirrolina-5-carboxilato redutase e γ -glutamil quinase, e diminuição na atividade da prolina oxidase. Possivelmente, o MeJa também influi sobre o conjunto enzimático atrelado ao metabolismo do aminoácido em questão. Zhang et al. (2016) ao estudarem este elicitor obtiveram elevações na atividade da arginase, enzima responsável por catalisar a conversão de arginina a ornitina, precursor da prolina. É possível que essa ativação também tenha ocorrido no presente trabalho.

Para avaliar a correlação existente entre as variáveis avaliadas, a análise de Pearson foi realizada. De acordo com os resultados, as variáveis betanidina e betanina foram as responsáveis pelo maior número de correlações significativas no presente trabalho (Tabela 1). Os pigmentos correlacionaram-se com $r^2 = 1$ e essa resposta deve-se ao fato de ambas compartilharem de vias metabólicas e substratos.

Ambas, inclusive com o mesmo valor, $r^2 = -0,626$, apresentaram correlação negativa com a prolina. A síntese dessas moléculas demanda alto valor energético e o fornecimento concomitante de substratos seria dispendioso. Este resultado indica que, na situação de estresse imposta pelas condições de cultivo, ocorreu divisão de esqueletos de carbono e nitrogênio.

Tabela 1. Análise de correlação entre compostos bioativos (flavonoides, betanidina, betanina, amarantina e betaxantina), potencial osmótico, prolina e glicina betaína em plantas de *A. cruentus*, cv Alegria, cultivadas in vitro e mantidas na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS) nas concentrações de 0 (controle) e 100 μ M, por 24, 48, 72 e 96 horas. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. que: quercetina; bet: betanidina; ama: amarantina; pro: prolina; po: potencial osmótico; gb: glicina betaína; bnn: betanina; mir: miraxantina.

	que	bet	ama	pro	po	gb	Bnn	Mir
que		-0,001	0,236	-0,047	0,037	0,056	-0,001	0,079
bet			-0,144	-0,626**	-0,341*	-0,198	1**	0,266
ama				-0,136	0,237	-0,188	-0,144	0,168
pro					0,127	0,429**	-0,626**	-0,226
po						0,114	-0,341*	0,273
gb							-0,198	0,448**
bnn								0,266
mir								

A prolina também é conhecida por ser um precursor dos pigmentos betaxantínicos (MINALE et al., 1965). Dessa forma, é natural que ocorra

direcionamento do mesmo para formação dessas moléculas em detrimento à produção de betacianinas. El-Sherbeny et al. (2013) relataram correlação positiva entre este aminoácido e os conteúdos de clorofilas *a/b* e carotenoides em *Beta vulgaris*, planta pertencente à ordem *Caryophyllales* assim como *A. cruentus*. Portanto, nessas espécies é notável o papel regulatório da prolina em vias biossintéticas de pigmentos.

Outra importante correlação, também negativa, foi observada com o potencial osmótico, com valor de $r^2 = -0,341$ tanto para betanidina quanto para betanina. A literatura relata a atuação de pigmentos, como antocianinas, na regulação do ajuste osmótico. A espécie estudada não possui esta classe de moléculas e, embora antocianinas e betacianinas não sejam encontradas juntas na mesma planta, seus padrões de distribuição são semelhantes, sugerindo analogia funcional entre ambos os grupos de pigmentos e, assim, as duas moléculas podem ter auxiliado em tal função (SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ et al., 2004; HUGHES et al., 2013).

Foi observada correlação positiva entre as variáveis miraxantina e glicina betaína ($r^2 = 0,448$). Este resultado sugere que, neste caso, ocorreu alocação de nitrogênio de forma homogênea entre ambas as moléculas, já que ambas são constituídas por este importante nutriente.

As plantas acumulam solutos compatíveis para mitigar os efeitos deletérios causados por estresses. Existe correlação entre a síntese desses compostos e aumento na tolerância a condições adversas (RHODES; HANSON, 1993; HASEGAWA et al., 2000; ASHRAF; FOOLAD, 2007). Os dois osmólitos investigados no presente trabalho correlacionaram-se de forma positiva ($r^2 = 0,429$). A colina, precursora da glicina betaína, pode também auxiliar na produção de outros osmólitos (RHODES; HANSON, 1993) e, possivelmente, ocorreu estímulo na síntese deste composto o qual originou ambas as moléculas. Além disso, de acordo com Waditee et al. (2002), há elevada similaridade entre os transportadores de glicina betaína e prolina, facilitando a mobilização dos mesmos.

O potencial osmótico é uma propriedade coligativa e, portanto, varia em função da concentração molar de solutos dissolvidos. Curiosamente, no nosso trabalho não observamos correlação entre esta variável e os dois principais osmólitos estudados. Contudo, a função majoritária de ajuste osmótico foi

possivelmente realizada pelos pigmentos betalâmicos, dado o alto custo energético requerido para a síntese de pigmentos e moléculas como glicina betaína e prolina. Esse resultado valida a refinada estratégia das plantas de *A. cruentus* em sintetizarem compostos com múltiplas funções em detrimento a outros com menor importância em situação de estresse.

O presente estudo é o primeiro a avaliar o potencial dos elicitores MeJa e AS para acúmulo de compostos bioativos em plantas de *A. cruentus* cultivadas in vitro.

2.4 Conclusões

A presença dos elicitores no meio de cultivo in vitro, na concentração de 100 μ M, promove o acúmulo de flavonoides e amarantina em *A. cruentus*, cv. BRS Alegria. Plantas tratadas com MeJa induzem a realização do ajuste osmótico, superando a condição de estresse imposta.

3 CAPÍTULO III - Produção de compostos bioativos em *Amaranthus cruentus* L., em cultivo hidropônico na presença de metil jasmonato e ácido salicílico

3.1 Introdução

Amaranthus cruentus L. é uma espécie pertencente à família *Amaranthaceae*, ordem Caryophyllales, consumido em diferentes regiões do mundo (PITTELKOW et al., 2019). Essa espécie foi adaptada ao clima e solo brasileiro pela EMBRAPA Cerrados (Planaltina-DF) e denominada de cultivar BRS-Alegria (SPEHAR et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2003). O interesse na cultura reside em seu excepcional valor nutricional e potenciais benefícios à saúde (TANG; TSAO, 2017). Exibe valores elevados de proteínas (15%), lipídeos (4%), fibras (13%) e minerais (4%), quando comparado com a maioria dos cereais (CAPRILES et al., 2008; MAKOBO et al., 2010).

O aproveitamento da planta é integral, sendo suas folhas, flores e caules consumidos como verdura e os grãos, inteiros ou moídos, são utilizados como cereais em diversas preparações (BECKER et al., 1981; SAUNDERS, BECKER, 1984; TEUTONICO; KNORR, 1985; EARLY; EARLY, 1987; WALTERS, 1987; BREENE, 1991; BRESSANI, 1998). Adicionalmente, possui características agrônômicas vantajosas devido a sua adaptação a diferentes altitudes e condições climáticas (SPEHAR et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2003). Além de sua excelente qualidade nutricional, o amaranto contém compostos promotores de saúde, como proteínas que geram peptídeos bioativos, compostos fenólicos e betalaínas (PAŠKO et al., 2008; HUERTA-OCAMPO; DE LA ROSA, 2011; SABBIONE et al., 2016).

Numerosos estudos relatam as diversas atividades farmacológicas dessas moléculas, como a atuação na redução de doenças como osteoporose, tumores, patologias pulmonares e cardiovasculares. A rutina e seu precursor, quercetina, pertencem à classe dos flavonoides e apresentam elevada capacidade antioxidante e, portanto, podem ser amplamente exploradas no campo medicinal devido as suas propriedades (KALINOVA; DADAKOVA, 2009).

Betalaínas são pigmentos sintetizados a partir da tirosina e constituem classe de metabólitos secundários encontrados exclusivamente em espécies da ordem Caryophyllales (SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ et al., 2004). Também apresentam elevada atividade antioxidante e podem ser empregadas como

corantes naturais alimentícios, em fármacos e cosméticos impulsionando pesquisas nesta área (CAI et al., 2003). As principais vantagens do uso das referidas moléculas são sua maior disponibilidade, em relação aos flavonoides, e estabilidade superior em comparação com as antocianinas (KANNER et al., 2001; STINTZING; CARLE, 2004).

A crescente demanda por dietas balanceadas, ricas em alimentos funcionais, torna os vegetais componentes-chave na rotina alimentar, evidenciando ainda mais a importância do amarantho no contexto atual (MARTIN et al., 2011).

Por milênios, as plantas medicinais têm sido valiosas fontes de agentes terapêuticos e, ainda, muitos medicamentos atuais provêm de vegetais (KINGHORN et al., 2011; NEWMAN; CRAGG, 2012), consolidando o fato de que as plantas continuam a ser a principal fonte de moléculas bioativas (DIAS et al., 2012; PAN, 2014; RAOMAI et al., 2015). Na grande maioria dos casos, os tratamentos convencionais com drogas sintéticas podem gerar efeitos colaterais nos pacientes. Além disso, inúmeros corantes sintéticos, empregados na indústria cosmética e alimentícia, apresentaram efeitos negativos sobre a saúde dos usuários (DOWNHAM; COLLINS, 2000; KUMAR; SINHA, 2004).

O metabolismo secundário vegetal é o responsável majoritário pelo fornecimento de compostos bioativos (GAWLIK-DZIKI, 2013) e desempenham papel crucial nas interações entre a planta e o meio ambiente, atuando na indução de respostas defensivas contra estresses bióticos e/ou abióticos (DIXON, 2001; KENNEDY; WIGHTMAN, 2011; KLIEBENSTEIN; OSBOURN, 2012). Servem ainda como atrativos para polinizadores e dispersores de sementes, atuando também como alelopáticos. Entretanto, o rendimento desses produtos é baixo e/ou restrito a locais específicos da planta ou região (KOLEWE et al., 2008). Dessa forma, a obtenção de moléculas de interesse fica aquém da demanda comercial, sendo necessárias estratégias para superar esse desafio.

Inúmeros esforços têm sido realizados com o intuito de caracterizar a natureza dos metabólitos secundários do ponto de vista de suas atividades biológicas, estruturas químicas, biossíntese e funções nas plantas, bem como seu uso farmacológico (CROTEAU et al., 2000). A crescente importância comercial dos supracitados compostos resultou em grande interesse, em

particular, na possibilidade de alterar a produção dos mesmos, no intuito de aprimorar a sua síntese (ZHAOA et al., 2005).

Dentre as técnicas atualmente existentes, a elicitación emerge como estratégia atraente para o aprimoramento da síntese de fitoquímicos (SHAKYA et al., 2019). Consiste na exposição da planta a um fator ambiental ou a determinada molécula, ativando uma cascata de transdução de sinais, medeando a expressão de genes relacionados à biossíntese de metabólitos alvo, desencadeando inúmeras alterações metabólicas no vegetal (JONES; DANGL, 2006; VAN WEES et al., 2008).

O Metiljasmonato (MeJa) e o ácido salicílico (AS) são hormônios relacionados às respostas defensivas, desempenhando papéis significativos na regulação do metabolismo contra numerosos estresses bióticos e abióticos, sendo ainda potentes elicitores (SUN et al., 2012; MONZO'N et al., 2012; ZŁOTEK et al., 2014; HUANG et al., 2015). O tratamento hormonal é considerado simples, ecológico e relativamente viável do ponto de vista comercial para aumentar a síntese de fitoquímicos, aprimorando a qualidade das plantas destinadas ao consumo humano (THIRUVENGADAM et al., 2016).

Diversas espécies possuem protocolo de cultivo celular já estabelecido, porém, muitas vezes não ocorre produção em quantidade satisfatória dos metabólitos de interesse (OKSMAN-CALDENTY; HILTUNEN, 1996; RAO; RAVISHANKAR, 2002). Além disso, alguns elicitores, a exemplo do MeJa, são considerados aceleradores do envelhecimento celular (PEROTTI et al., 2010; LAMBERT et al., 2011, CHEE et al., 2015; DANAEE et al., 2015), tornando-os opção arriscada para emprego in vitro, já que o contato permanente com o tecido vegetal, por tempo prolongado pode causar toxidez na planta, atrapalhando o crescimento/desenvolvimento do vegetal e o acúmulo de moléculas de interesse.

Dessa forma, o sistema hidropônico, técnica a qual consiste no cultivo de plantas em meio líquido, onde são fornecidos os macro e micronutrientes (HAYDEN, 2006), constitui interessante alternativa à produção de espécies com propriedades passíveis de exploração comercial. Apresenta ainda vantagens sobre o plantio diretamente no solo, como maior rendimento por unidade de área e melhores padrões de qualidade da biomassa colhida, sendo essa isenta de impurezas, facilitando o processamento do material obtido (PARDOSSI et al., 2005).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade elicitora do MeJa e As para induzir o ajuste osmótico, incrementar a produção de metabólitos bioativos bem como a capacidade antioxidante de plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria.

3.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e em laboratórios pertencentes à Universidade Federal de Pelotas (UFPel), município do Capão do Leão/RS, no período compreendido entre abril e maio de 2017. Foram utilizadas sementes da cultivar de *A. cruentus*, BRS Alegria, semeadas em bandejas de polipropileno contendo substrato tipo turfa fértil. Após a germinação, as plântulas foram irrigadas e receberam solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) a cada quatro dias, até atingirem 30 dias. Posteriormente, as plantas foram transferidas para sistema hidropônico de fluxo contínuo, com raízes flutuantes, com solução nutritiva de Hoagland, meia força, por sete dias para aclimação ao método. Como controle, utilizou-se a solução nutritiva, anteriormente citada e, para o tratamento com elicitor, a mesma solução com acréscimo de MeJa ou AS, ambos na concentração de 100 µM.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4 (elicitores - ausência, MeJa e As x períodos de coleta – 24, 48, 72 e 96h), totalizando 12 tratamentos, compostos por três repetições, sendo cada unidade experimental representada por um vaso em hidroponia contendo cinco plantas de *A. cruentus*.

A glicina betaína (GB) foi avaliada de acordo com Grieve; Grattan (1983), com adaptações. Os extratos foram preparados com adição de 1 mL de água deionizada para 0,25 g de material moído sendo agitados durante 24 horas a 25 °C. Posteriormente, foram filtrados e armazenados a -17 °C até a realização das análises. Os extratos foram descongelados e misturados na proporção de 1:1 com H₂SO₄ 2N sendo em seguida mantidos em água gelada durante 1 hora. Posteriormente a reação recebeu 0,2 mL de KI-I₂, permanecendo a 4 °C durante 16 horas, com subsequente centrifugação a 11872g por 15 minutos à 0 °C. O sobrenadante foi descartado, permanecendo os cristais de periodato formados, os quais foram dissolvidos em 0,9 mL de 1,2-dicloroetano. Após 2 horas e 30

minutos, foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 365 nm no espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mmol de GB g⁻¹ MF.

O potencial osmótico foi determinado com auxílio de osmômetro de pressão de vapor modelo 5600 VAPRO (Wescor, Logan, Utah, EUA). Amostras foliares e caulinares de aproximadamente 700 mg foram maceradas em tubos de polipropileno com capacidade para 2 mL com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, o extrato obtido foi centrifugado a 12000g, a temperatura de 4 °C durante 20 minutos. Utilizou-se alíquota de 10 µL para realização das leituras. Para conversão dos valores de mmol kg⁻¹ a potencial osmótico (Ψ_s), utilizou-se a equação de Van't Hoff em que $\Psi_s = -C \times 2,58 \times 10^{-3}$, na qual C é o valor de osmolalidade.

A quantificação da enzima fenilalanina amônia-liase seguiu metodologia proposta por Mori et al. (2001); El-Shora (2002), com adaptações. Tecidos foliares e caulinares (3 g) foram macerados na presença de 3 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,4 e 0,5 g de polivinilpirrolidona (PVP). Posteriormente, ocorreu a centrifugação a 3300 g por 20 min a 4 °C. A reação foi composta por 100 L do extrato enzimático, 580 L de tampão Tris-HCl 100 mM e 200 L da solução de L-fenilalanina 40 mM, sendo incubada a 30 °C por 60 min. Em seguida, houve interrupção da mesma pela adição de 100 µL de HCl 6 M. A análise envolve a desaminação não oxidativa da fenilalanina através da reação espontânea catalisada pela fenilalanina amônia-liase.

Os ácidos hidroxicinâmicos foram determinados em meios de reação contendo 25 µL de extrato de amarantho diluído em etanol 70 % na concentração 1:10, 50 µL de HCl 1,5 N, 50 µL de NaNO₂ a 10 %, 50 µL de Na₂MoO₄ a 10 %, 50 µL de NaOH 2N e 25 µL de H₂O MilliQ. 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.

O teor total de fenol solúvel 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. Em resumo, a reação foi composta por 190 µL de água MilliQ, 12,5 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 10 µL de extratos de

amaranto diluídos com etanol 70%, na concentração 1: 10. Em seguida, foram adicionados 75 µL de Na₂CO₃ 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.

O teor total de flavonoides foi medido em 37,5 µL das amostras, 37,5 µL de metanol, 75 µL de Na₂NO₂ a 5 % e 75 µL de AlCl₃ a 10 %. Os meios de reação permaneceram 6 minutos no escuro e depois foram adicionados 125 µL de NaOH 1N. Foi utilizada curva padrão de rutina (quercetina-3-rutinosido), com a concentração variando de 0-3000 µM e a absorbância foi determinada a 510 nm. Para fins de cálculo, a equação da curva padrão e o coeficiente de regressão obtido foram aplicados, sendo $y = 0,0003 x + 0,0439$ e $r^2 = 0,9993$, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos, os caules foram escolhidos para quantificação dos compostos quercetina e rutina em cromatógrafo. Aproximadamente 1 g de tecido caulinar de cada amostra foi aferido e macerado em 6 mL de metanol e 980 µL de ácido clorídrico. Posteriormente, as amostras permaneceram em banho-maria a 35° C, na ausência de luz, por 24 horas. Após centrifugação, o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador a 40 °C durante 30 minutos, sendo redissolvido em metanol até o volume de 2 mL. As amostras passaram novamente por centrifugação sendo injetados 30 µL no cromatógrafo. O tempo de corrida foi de 42 minutos, com fluxo de 0,9 mL min⁻¹, pressão de 100 kgf.cm²⁻¹, comprimento de onda de 280 nm. A fase móvel foi composta por A: solução aquosa de ácido acético (99:1, %v/v) e B: 100% de metanol. Os resultados foram expressos em µg 100g⁻¹ MF.

A extração da betanina e betanidina foi realizada com dois tipos diferentes de tampão extrator. Para betanidina, tampão acetato de sódio 10 mM e metanol (70/30%), além de ascorbato de sódio 10 mM (pH 5,0). Para betanina, tampão fosfato de potássio 10 mM, acrescido de ascorbato de sódio 10 mM (pH 6,0), sem adição de solvente orgânico. Para as duas análises foram utilizadas 125 mg de massa fresca, maceradas em almofariz e o extrato centrifugado a 10000g, por 20 minutos a 4 °C, como descrito por Reis et al. (2017). O coeficiente de extinção molar utilizada para o cálculo de betanidina foi de $\epsilon = 54000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e para betanina de $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em comprimento de onda de 536 nm. Os resultados foram expressos em mg de betanidina em 100 g de massa fresca e

mg de betanina em 100 g de massa fresca. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS modelo Ultrospec 7000 - GE Healthcare.

Para a extração de amarantina, tecidos foliares foram macerados em almofariz com tampão fosfato 10 mM, pH 6,0, acrescido de ascorbato de sódio, na mesma concentração. O homogeneizado foi centrifugado a 10000g, por 20 minutos, a 4 °C, de acordo com Reis et al. (2017). A concentração de amarantina foi determinada levando-se em consideração o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 56600 \text{ M cm}^{-1}$, em comprimento de onda de 536 nm. O resultado foi expresso em mg de amarantina por 100 gramas de massa fresca.

As betaxantinas seguiram protocolo descrito por Reis et al. (2017), com a mesma metodologia anteriormente descrita para betaninas. A concentração de betaxantina foi dada através do coeficiente de extinção molar para miraxantina $\epsilon = 48000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em comprimento de onda de 480 nm e o resultado, expresso em mg de miraxantina por 100 gramas de massa fresca.

O poder antioxidante de redução do ferro foi determinado de acordo com Katalinic et al. (2006). O reagente FRAP foi preparado com a adição de 10 volumes de tampão de acetato 0,3 M, pH 3,6, um volume de 10 mM 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) em ácido clorídrico (40 mM) e um volume de cloreto férrico 20 mM. Posteriormente, foram misturados 300 μL de reagente FRAP com 30 μL de água MilliQ e 10 μL dos extratos de amaranto diluídos com etanol a 70% (1:10). A absorbância foi mensurada em 593 nm e a curva padrão esteve na faixa de 0-7000 μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Para fins de cálculo, a equação da curva padrão e o coeficiente de regressão obtido foram aplicados, sendo $y = 0,0002 x + 0,1906$ e $r^2 = 0,9964$, respectivamente. Os resultados foram expressos em μmol de Fe (II) por grama de massa seca.

A atividade de eliminação do radical DPPH foi determinada de acordo com Pérez-Tortosa et al. (2012), adicionando-se 250 μL de uma solução alcoólica de DPPH a 20 μL de extratos de amaranto diluídos com etanol 70% na concentração 1:100. Após 2,5 h de incubação, a absorbância foi mensurada a 517 nm. As leituras foram comparadas com curva de calibração do ácido cafeico em concentração entre 0 e 1500 μM . Para fins de cálculo, a equação da curva padrão e o coeficiente de regressão obtido foram aplicados, sendo $y = 0,0010 x + 0,0376$ e $r^2 = 0,9937$, respectivamente. Os resultados foram expressos como μmol de ácido cafeico por grama de massa seca.

O radical ABTS foi medido utilizando o método de Katalinic et al. (2006) com pequenas modificações. A solução de ABTS foi diluída com etanol até absorvância de $0,70 \pm 0,02$. Após 60 min de incubação, a absorvância da solução foi medida a 734 nm. O ácido cafeico foi usado como antioxidante padrão (0-1500 μM). Para fins de cálculo, a equação da curva padrão e o coeficiente de regressão obtido foram aplicados, sendo $y = 0,0009x + 0,0078$ e $r^2 = 0,9785$, respectivamente. A atividade foi expressa como μmol de ABTS reduzido por grama de massa seca.

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$), as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro por meio do Programa Estatístico R Studio e, em caso de interação significativa entre os fatores, as variáveis Y_{ijk} originais foram padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral de forma a manter sempre valores positivos, conforme equação abaixo:

$$Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$$

As pressuposições da ANOVA foram testadas:

- a) modelo aditivo
- b) independência dos erros (Σ_{ijk})
- c) normalidade dos erros (Σ_{ijk})
- d) variância dos erros homogêneos

Assim,

$$Y_{ijk} = u + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \Sigma_{ijk}$$

Y_{ijk} representa o valor da variável;

i, o índice do fator tempo;

j, o índice do fator tratamento;

k, o índice do número de repetições;

u, a média geral;

α_i , efeito do tempo i;

β_j , o efeito do tratamento j;

$(\alpha\beta)_{ij}$, o efeito da interação tempo por tratamento ij;

Σ_{ijk} , resíduo do modelo A.

3.3 Resultados e discussão

O processo de eliciação ocasiona diversas perturbações no metabolismo das plantas, caracterizando-se, portanto, como período de estresse (ZHAO et al., 2005). Este tipo de modificação na condição normal dos vegetais pode promover mudanças como diminuição do potencial osmótico, com acúmulo de compostos de baixa massa molecular e osmoticamente ativos, a fim de manter a homeostase celular. Glicina betaína é um exemplo de osmólito extensivamente estudado em várias culturas (TIAN et al., 2017). Este composto pode mitigar os danos oxidativos, estabilizando membranas e protegendo proteínas (CHEN; MURATA, 2011).

Para a variável glicina betaína, o efeito do MeJa em plantas de *A. cruentus* promoveu respostas mais intensas somente nos caules. Para este elicitor, a síntese do composto (Figura 1A-1B) seguiu exatamente a mesma tendência, tanto nos tecidos foliares quanto nos caulinares, sendo ligeiramente maior nestes últimos, com incrementos nas primeiras 48 horas e a partir das 72. Contudo, o potencial osmótico (Figura 1C- 1D) refletiu a sua presença somente nas folhas. Nos caules, a referida molécula demonstra não ter influenciado na concentração de solutos e, possivelmente, este papel foi cumprido por outros compostos.

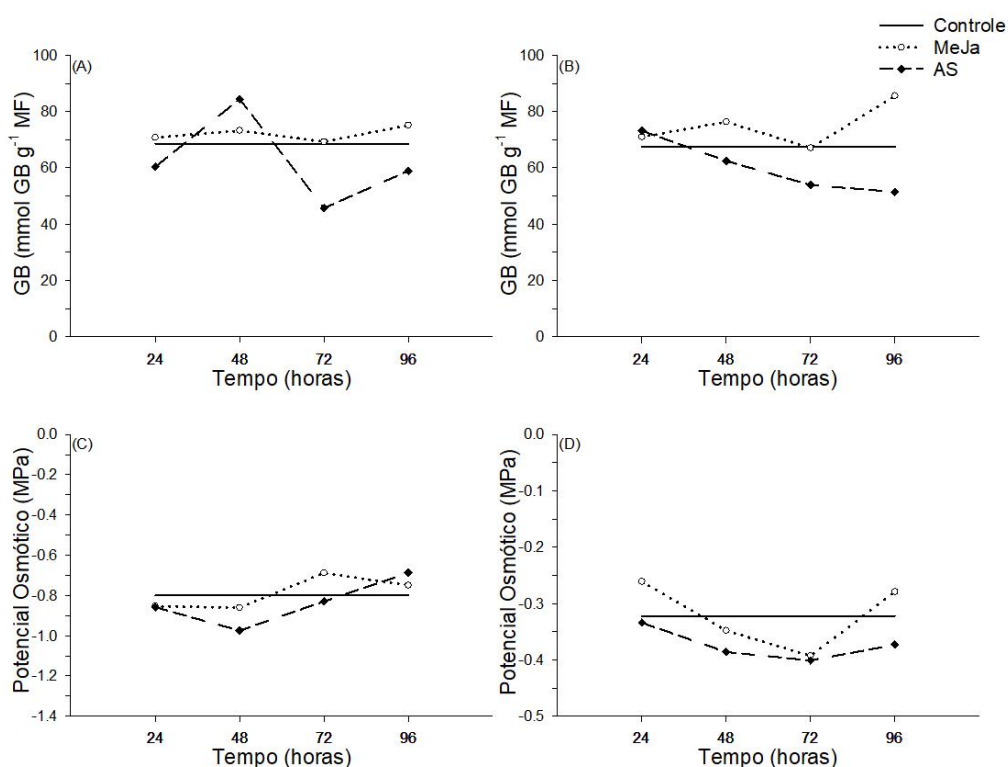


Figura 1. Teor de glicina betaína (A-B) e potencial osmótico (C-D) presentes em tecidos foliares (A e C) e caulinares (B e D) de plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas em

sistema hidropônico, na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 µM, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

Ao contrário do observado no presente trabalho, resultados relatados por Xu et al. (2018), em *C. lanatus* sugerem que a transdução de sinal dos jasmonatos está envolvida na biossíntese de glicina betaína, evidenciando o fundamental papel do referido fito-hormônio na tolerância ao estresse e essa constatação está possivelmente associada à concentração utilizada e também ao tempo de exposição ao elicitador.

Sorial et al. (2010) verificaram a capacidade do MeJa em tornar mais negativo o potencial osmótico de *Ocimum basilicum*. É provável que outras moléculas tenham realizado tal ajuste, a exemplo de pigmentos. Além disso, para plantas tratadas com MeJa, o efeito estressante foi mais pronunciado nos tecidos caulinares, onde ocorreram modificações mais marcantes na síntese de GB bem como na redução do potencial osmótico.

Ainda em relação à glicina betaína, o AS promoveu comportamento similar ao MeJa nas folhas, porém com valores mais contrastantes entre cada período de avaliação (Figuras 1A-1B). Nos caules, a concentração deste osmólito foi superior ao controle somente nas primeiras 24 horas, com queda progressiva ao longo do tempo. Khan et al. (2014) mostraram a indução do AS no acúmulo de glicina betaína em *Vigna radiata*. Assim como discutido para o outro elicitador, a imposição dos fito-hormônios não incrementou de forma marcante a síntese do osmólito, possivelmente pelo fato de ambos terem atuado no incremento de compostos do metabolismo secundário, realocando compostos carbônicos e nitrogenados para os mesmos.

Entretanto, em relação ao potencial osmótico foliar, pode-se inferir que possivelmente a glicina betaína promoveu marcante influência sobre esta variável, especialmente nas 72 horas. Nas últimas 24 horas de avaliação, apesar do incremento em sua concentração, este não foi suficiente para gerar modificações no potencial osmótico. Em relação a esta variável nos caules, é provável que a diminuição do mesmo tenha sido ocasionada por outro osmólito, possivelmente pigmentos os quais também possuem esta função. A produção de amarantina e miraxantina (dados a serem discutidos posteriormente)

seguiram tendência análoga à obtida para a variável. É possível que ambas tenham promovido a redução dos valores.

Alguns pigmentos como antocianinas são capazes de atuar sobre o ajuste osmótico. Em *A. cruentus* esta classe de moléculas é substituída por betalainas, porém seus padrões de distribuição são semelhantes, sugerindo conformidade funcional entre ambos os grupos de pigmentos podendo assim, ter auxiliado em tal função (SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ et al., 2004; HUGHES et al., 2013). Além disso, Marcińska et al. (2013), verificaram que o AS promoveu o acúmulo de diferentes osmólitos compatíveis, tais como açúcares e prolina em plantas de *Triticum aestivum*. Resultados observados por Khripach et al. (2003) demonstraram que a aplicação exógena de AS foi capaz de manter o status hídrico em *Oryza sativa*, através da promoção da síntese de ácidos nucleicos, proteínas (BAJGUZ, 2000), prolina, fenólicos e antocianinas, moléculas as quais são importantes na tolerância ao estresse em muitas espécies vegetais (ANURADHA; RAO 2001; WAHID; GHAZANFAR, 2006; WAHID, 2007). Possivelmente estes mecanismos tenham sido estimulados nos caules de *A. cruentus* tratadas com o referido elicitor.

Os estudos relacionados às relações existentes entre o status hídrico e a elicitação ainda permanecem escassos (HASSINI et al., 2017) e as respostas obtidas necessitam de maior elucidação.

A fenilalanina amônia-liase (FAL) catalisa o primeiro passo na rota dos fenilpropanoides, levando a L-fenilalanina a sofrer desaminação, produzindo amônia e trans-cinamato (DIXON et al., 2002). Assim, a biossíntese dos flavonoides, isoflavonoides, antocianinas, fitoalexinas e ligninas são dependentes da atividade da enzima (PASCUAL et al., 2016; DEMPSEY; KLESSIG, 2017), portanto, incrementos em sua ação são refletidos em acréscimos nos metabólitos secundários sintetizados (ZHAO et al., 2010).

Os derivados do ácido hidroxicinâmico são importantes classes de compostos polifenólicos em plantas. Os ácidos cinâmico, p-coumarico, ferúlico, cafeico, clorogênico e rosmarínico pertencem a esta classe. Possuem potentes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (ALAM et al., 2016).

Para as plantas tratadas com MeJa, nas folhas, o desempenho da FAL foi oscilante (Figura 2A) e análogo à formação de ácido hidroxicinâmico, especialmente até as 72 horas, onde ocorreu estabilização na atividade

enzimática. Ainda assim, a FAL foi eficiente e conseguiu manter elevação no teor do composto anteriormente citado. O primeiro período analisado foi correspondido com incrementos marcantes na atividade da enzima. Após, decréscimo e novo aumento foram observados. Wang et al. (2009) e Bi et al. (2007) também observaram incrementos na atividade da FAL em frutos de morango e em *Oryza sativa*, respectivamente, submetidos a aplicação do MeJa. Contudo, as instabilidades verificadas podem estar associadas ao caráter constitutivo da FAL, ficando essa compartimentalizada nos vacúolos, sendo necessários outros fatores de ativação na planta como aumentos do nível de aminoácido L-fenilalanina, por exemplo (FERRER et al., 2008).

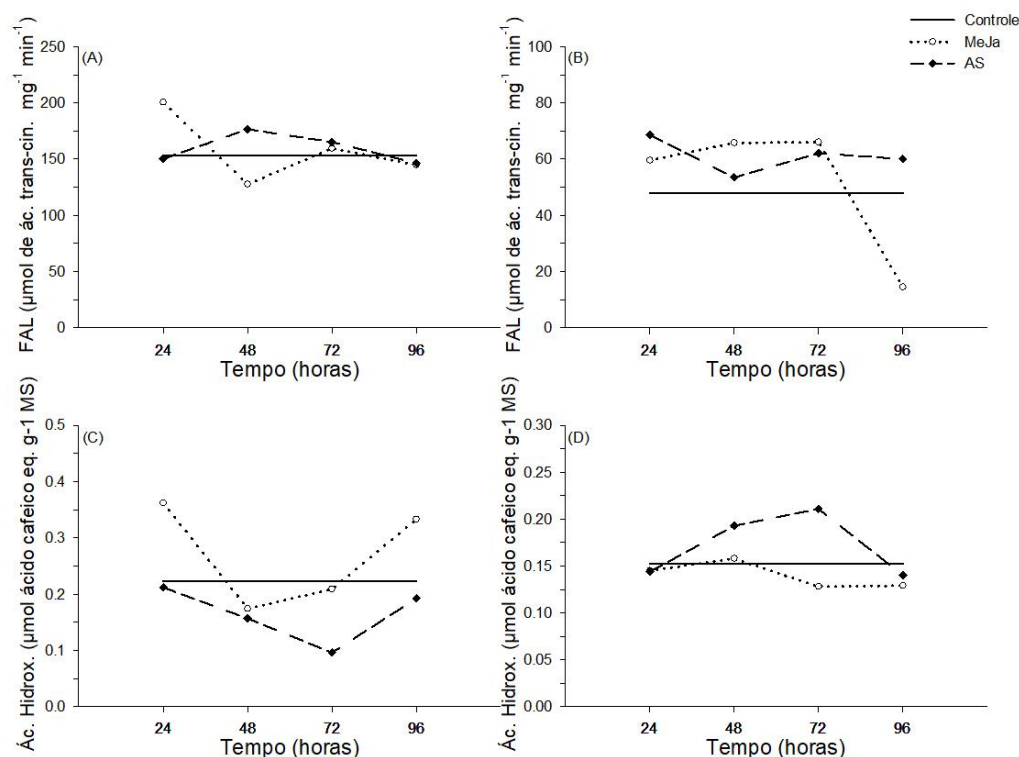


Figura 2. Atividade da enzima fenilalanina amônia – liase (FAL) (A-B) e teor de ácidos hidroxicinnâmicos (C-D) presentes em tecidos foliares (A e C) e caulinares (B e D) de plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas em sistema hidropônico, na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 μ M, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

Nos tecidos caulinares (Figura 2B), os elicitores promoveram ativação da FAL logo nas primeiras 24 horas após sua aplicação. A ação manteve-se elevada

até o período de 72 horas, com posterior queda. A presença de ácidos hidroxicinâmicos observada foi similar à atividade da FAL somente nas primeiras 24 horas e, sua concentração foi menor em relação ao outro órgão. É possível que a transformação deste composto em outras moléculas do metabolismo secundário tenha ocorrido de forma mais rápida em relação às observadas nos tecidos foliares. A média de atividade nos caules foi menor em relação às folhas, entretanto, possivelmente esta foi mais eficiente na conversão já que a presença de ácidos hidroxicinâmicos nestes órgãos foi muito similar em relação às folhas. Fator pertinente a esta enzima é que sua atividade é dependente de suas cinco isoformas. Em muitos organismos a FAL tem apresentado condições ótimas de atuação, diferentes para cada espécie, tecido ou órgão (BAGAL et al., 2012).

Nos tecidos foliares das plantas tratadas com AS, a FAL obteve incremento em sua atividade a partir das 24 horas, chegando ao seu pico no segundo período de avaliação. Nos momentos posteriores, queda foi observada. A presença de ácidos hidroxicinâmicos foi similar à ação da FAL somente as 24 e 72 horas, após a aplicação dos elicitores. Assim como relatado para o tratamento MeJa, neste caso, também é possível que a transformação deste composto em outras moléculas do metabolismo secundário tenha ocorrido de forma mais acelerada em relação à observadas nos tecidos foliares.

Nos caules, atividade enzimática manteve-se acima do controle durante todo o período de avaliação. Entretanto, os ácidos hidroxicinâmicos igualaram-se as 24 e 96 horas, após indução do AS. Yao; Tian (2005) demonstraram que o AS estimula a atividade da FAL com consequente produção dos principais compostos fenólicos em *Prunus avivum*. Dados obtidos por Gai et al. (2018) comprovaram a atuação dos elicitores estudados na regulação positiva de genes relacionados à referida enzima, corroborando as respostas observadas. Para os ácidos hidroxicinâmicos, resultados similares foram observados por Thiruvengadam et al. (2015), onde plantas de *Brassica rapa* tratadas com MeJa e AS apresentaram incrementos nos conteúdos.

Inúmeros fatores ambientais podem desencadear a atividade da FAL, como o fornecimento de nutrientes, condições de luminosidade (incluindo radiação UV), ataques patogênicos, concentração atmosférica de CO₂ e oscilação da temperatura (KENRICK; CRANE, 1997; HUANG et al., 2010). Neste

sentido, é necessário considerar que os metabolismos primário e secundário estão estreitamente ligados, sendo influenciados pelas taxas de substrato as quais podem estar disponíveis para as vias biossintéticas secundárias. Dessa forma, as inibições observadas podem estar relacionadas aos efeitos no metabolismo primário das plantas, sobre o qual os elicitores também possuem influência.

Compete aqui frisar que na mesma espécie podem ocorrer alternâncias na ação da enzima em diferentes partes da planta, a qual reage inibindo ou ativando-a, dependendo da condição ao qual está exposta (JANAS et al., 2010).

Os compostos fenólicos constituem a principal classe de metabólitos secundários vegetais. Incluem ácidos fenólicos e flavonoides, e particularmente, o último é um subgrupo altamente diversificado (EL-ZAEDDI et al., 2017). São reconhecidos como marcadores de estresse devido aos níveis aumentados observados quando os materiais vegetais estão sob condições adversas (LUCHO et al., 2018).

Os elicitores promoveram efeitos opostos nos teores de fenóis solúveis totais (FST) nas plantas de amaranto. Para o MeJa, nas primeiras 24 horas (Figura 3A-3B), nos tecidos foliares, ocorreu inibição na síntese, com posterior incremento nos teores, os quais foram superiores ao controle após 48 horas de tratamento. No momento final de avaliação, houve nova queda.

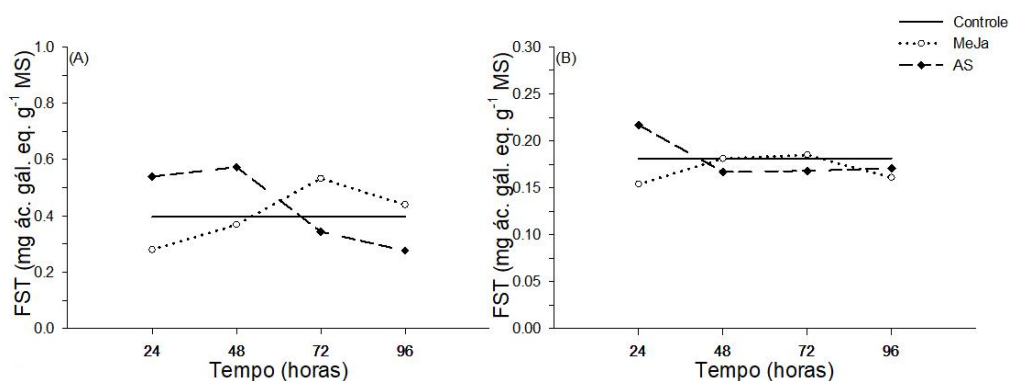


Figura 3. Fenóis solúveis totais (FST) presentes em tecidos foliares (A) e caulinares (B) de plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 μ M, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

Lucho et al. (2018) ao estudarem o efeito do referido elicitor sobre *Stevia rebaudiana* também obtiveram maiores incrementos nos níveis de FST nos períodos finais de avaliação, às 96 horas após o início dos tratamentos. Nos caules, similarmente, foi constatada repressão e, apesar da indução demonstrada no período 24-48 horas, as médias foram semelhantes ao tratamento sem elicitação. De acordo com Martínez-Espla et al. (2017), o efeito positivo do MeJa sobre o conteúdo fenólico pode ser atribuído ao seu papel na ativação da via fenilpropanoide, que é uma das respostas de defesa induzíveis responsáveis por levarem ao acúmulo de compostos como flavonoides.

Como citado anteriormente, no tratamento com AS (Figura 3A-3B) ocorreu efeito oposto em relação ao MeJa. Houve indução na síntese de FST, nos dois primeiros momentos de análise. Contudo, foi verificada queda a partir das 48 horas. Da mesma forma, nos caules ocorreu incremento no teor dos referidos compostos nas horas iniciais, com imediata redução a qual se manteve até o final do período. A diminuição nos fenólicos em plantas submetidas ao AS também foi relatada por Dixon; Paiva (1995) e por Ghasemzadeh; Jaafar (2012). Lucho et al. (2018) ao submeterem plantas de *Stevia rebaudiana* à concentração de 100 μ M de AS, constataram a ineficácia do elicitor em aprimorar o teor de FST, resposta possivelmente associada à baixa dose aplicada.

Alguns autores sugerem que o AS seja inibidor da enzima catalase, incrementando os níveis de H_2O_2 , o qual induz genes de expressão da FAL e a consequente síntese de fenólicos (CHEN et al., 1993; DOREY et al., 1997; DESIKAN et al., 1998; DIHAZI et al., 2003), o que poderia corroborar a elevação verificada para este elicitor.

Quando aplicados exogenamente, MeJa e AS, especialmente nas concentrações compreendidas entre 100–200 μ M, estimulam positivamente vias biossintéticas secundárias durante o período de 24 a 96 h, levando à produção elevada de inúmeros fitoquímicos (GIRI; ZAHEER, 2016; RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016). Assim, os elicitores podem ter diferentes tempos de ativação de determinadas rotas, acionando-as com eficiências distintas.

Além disso, o comportamento observado para compostos fenólicos está diretamente ligado a níveis mais elevados na atividade FAL, enzima chave no primeiro passo da via dos fenilpropanoides, diretamente envolvida na biossíntese dessas moléculas supracitadas (WANG et al., 2009; GEMA; RUIZ

DEL CASTILLO, 2014). No presente trabalho, tanto a ação da enzima quanto a síntese de fenólicos demonstraram tendências similares, corroborando a afirmação acima apresentada.

O papel dos flavonoides como possíveis substâncias terapêuticas adquiriu notável importância nos últimos anos devido as crescentes evidências de seus efeitos benéficos e protetores em relação a diferentes doenças (FRUTOS et al, 2019). Estão entre os metabólitos mais bioativos das plantas e constituem sistema antioxidante secundário, acionados como consequência da depleção da atividade de enzimas responsáveis pela detoxificação de espécies reativas de oxigênio (AGATI et al., 2012). As plantas desenvolveram extensa variedade de respostas de defesa sob condições adversas, incluindo a exposição aos elicitores (TAN et al., 2004) os quais levam à produção de vários compostos (ALI et al., 2006). Assim, moléculas sinalizadoras, incluindo o MeJa e o AS exibem extensas regulações para o metabolismo flavonoídico.

Para os flavonoides foliares, com exceção das primeiras 24 horas, as tendências demonstradas pelos elicitores foram opostas (Figura 4A). O MeJa apresentou médias acima do controle somente 72 horas após sua aplicação. Para o AS, os incrementos obtidos ocorreram no segundo e último períodos.

Nos caules, não ocorreu interação entre fatores. Para o fator tempo, foi observada tendência linear crescente, com os maiores valores obtido às 96 horas, após a aplicação dos tratamentos. O período de exposição a cada eliciador pode alterar a força da resposta e, portanto, influenciar o resultado final do conteúdo fitoquímico na planta (BAENAS et al., 2014; ZŁOTEK et al., 2014).

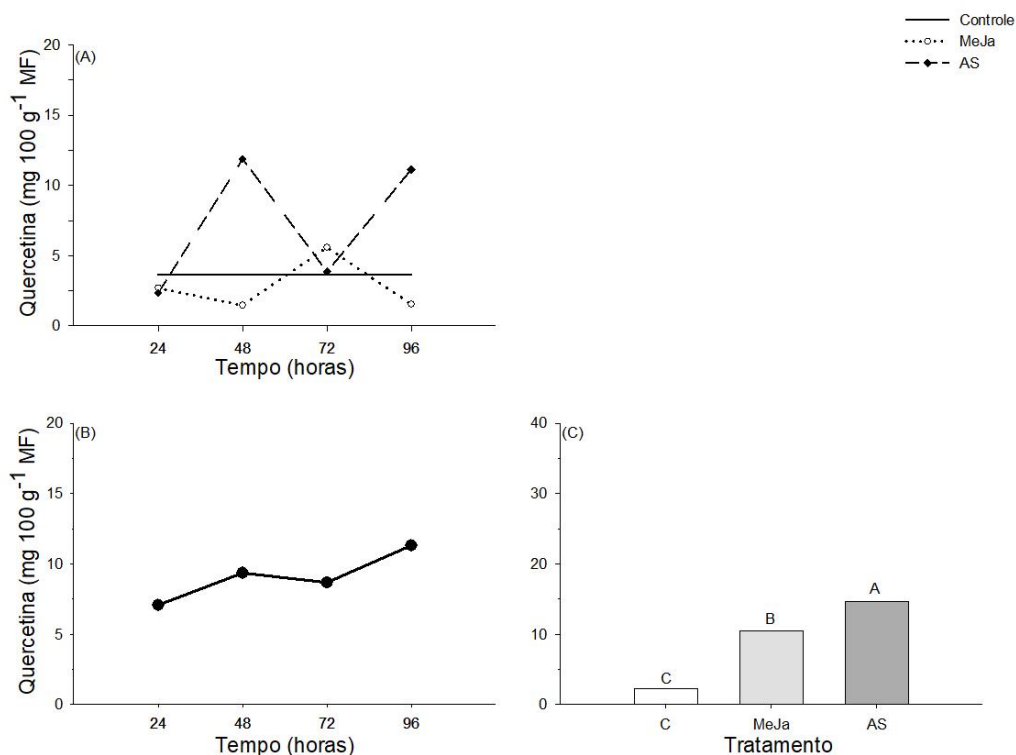


Figura 4. Teor de flavonoides presentes em tecidos foliares (A) e caulinares (B-C) de plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas em sistema hidropônico, na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 μ M, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

Para o fator elicitor, diferenças significativas foram observadas entre os três tratamentos, com destaque para o AS o qual exibiu a maior média, 14,67 seguido pelo MeJa, 10,47 e controle, 2,18. Os incrementos promovidos pelos fito-hormônios foram 6,73 e 4,80 vezes maiores em relação as médias observadas nas plantas isentas de elicitação.

Resultados obtidos por Conceição et al. (2006) demonstraram que plantas de *Hypericum perforatum* tratadas com MeJa foram capazes de aumentar o acúmulo de flavonoides. Para os resultados verificados nas plantas tratadas com este elicitor, é possível que tenham ocorrido disputas por substratos no metabolismo secundário, especialmente entre flavonoides, miraxantina e amarantina. Os dois últimos pigmentos exibiram tendências exatamente opostas ao primeiro composto, evidenciando a hipótese abordada. Além disso, é possível que nessas plantas, tenha ocorrido depleção de substratos essenciais à formação de metabólitos secundários, podendo estes terem sido ainda mobilizados a outros órgãos, como raízes e mesmo os caules, onde houve

considerável concentração de flavonoides. A via do chiquimato, que liga a biossíntese de flavonoides e o metabolismo do N nas plantas, catalisa carboidratos provenientes das vias da glicólise e da pentose fosfato para sintetizar aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). Em várias espécies de plantas, o estresse abiótico induz a expressão de genes biossintéticos de flavonoides e o seu subsequente acúmulo. No entanto, parece que essa elevação não é progressiva e, à medida que a pressão de estresse aumenta, a capacidade de sintetizar flavonoides diminui, indicando, neste sentido, que os tecidos foliares foram mais suscetíveis ao estresse por MeJa (ITHAL; REDDY 2004; BETTAIEB et al. 2011).

Estudo conduzido por Tajik et al. (2019), demonstrou a indução biossintética de flavonoides em plantas de *Crocus sativus* tratadas com AS. Os autores atribuem o aumento à produção de espécies reativas de oxigênio geradas pelo AS e seu papel na sinalização (TEWARI; PAEK, 2011). Essa afirmação é também corroborada por Navarro et al. (2016) os quais afirmam que estas moléculas são induzidas por condições ambientais de estresse.

Apesar da queda observada para fenóis totais, ocorreu elevação no índice de flavonoides. Esses resultados indicam que outros fenólicos possivelmente foram oxidados e/ou suas moléculas foram redirecionadas para formação de flavonoides.

A quercetina e seus glicosídeos são amplamente utilizados em aplicações medicinais, apresentando atividade inibitória de vários tipos de câncer, incluindo leucemia, mama, esôfago, cólon e câncer de pulmão (CHOI et al., 2001; NGUYEN et al., 2004; ONG et al., 2004), demonstrando assim potenciais benefícios terapêuticos (KELLY, 2011). A rutina também possui amplas aplicações comerciais, sendo empregada nas indústrias farmacêutica e alimentícia, atuando como antioxidante, corante, conservante, sendo incluída em diversas preparações multivitamínicas disponíveis no mercado (KIM et al., 2005; KODA; KURODA, 2008; TYSZCZUK, 2009).

Para a variável quercetina, os elicitores promoveram efeitos similares nas plantas. Nas primeiras 24 horas ocorreu queda neste composto, porém, já no segundo período de avaliação, o pico foi observado tanto para MeJa quanto para o AS, onde ambos atingiram médias de 92,378 e 92,163 mmol de ác. trans-cin.

$\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, sendo ambas 2,3 vezes superiores ao controle. Posteriormente, nova queda foi observada, a qual se manteve até o fim da avaliação.

Em relação à rutina, o MeJa provocou tendência crescente na concentração da molécula, com obtenção do máximo valor às 72 horas após aplicação dos tratamentos, alcançando $17,834 \text{ mmol}$ de ác. trans-cinâmico. $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, elevando em 13,549 vezes seu valor em relação ao tratamento isento de elicitação. Após este período, declínio foi observado. O AS também foi capaz de intensificar a presença do referido composto, promovendo aumentos desde às 24 horas. Entre o segundo e terceiro períodos, efeito platô foi exibido, indicando estabilidade na indução de rutina. O momento final da análise foi marcado por queda na concentração.

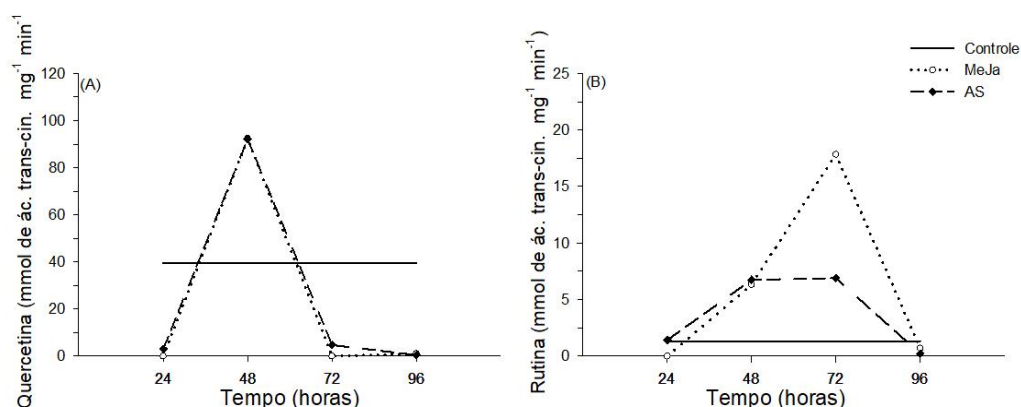


Figura 5. Teores de quercetina (A) e rutina (B) presentes em tecidos caulinares de plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e $100 \mu\text{M}$, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

Os resultados obtidos estão em concordância com os verificados por Thiruvengadam et al. (2016) os quais observaram que MeJa e AS foram capazes de induzir maior concentração de flavonoides em plantas de *Brassica rapa*, sendo quercetina e rutina os majoritários naquela espécie, ficando atrás apenas da catequina. Para as plantas tratadas com MeJa, o incremento nestes compostos pode estar relacionado ao aumento na atividade da FAL, enzima essencial nesta rota biossintética, a qual apresentou tendência crescente até as 72 horas.

Plantas sintetizam o AS a partir do ácido cinâmico e este processo tem os mesmos produtos intermediários da via biossintética da rutina, fator o qual pode ter favorecido o acúmulo do metabólito (SUN et al., 2012). Além disso, os mesmos autores demonstraram que genes relacionados à biossíntese da molécula foram positivamente regulados pelo fito-hormônio. Esses resultados sugerem o importante papel do AS na sinalização na via de biossíntese da rutina.

Apesar destes fatores, plantas tratadas com AS apresentaram menores teores de rutina em relação às submetidas ao MeJa. De acordo com Cheng et al. (2018), os efeitos promovidos pelo AS são dependentes da dose aplicada. Possivelmente, concentrações mais elevadas acarretariam em maior promoção da síntese deste composto flavonoídico e, em plantas de *A. cruentus*, o MeJa foi mais eficaz na indução do aumento de rutina.

A indústria deve concentrar-se na obtenção de altos rendimentos com maior qualidade nutracêutica para promover a saúde pública (LUCIANO et al., 2017). Os resultados observados em nosso trabalho indicam a eficiência dos elicitores em estimular as enzimas envolvidas na síntese de rutina e quercetina, promovendo o acúmulo destes valiosos compostos em tempos de tratamento relativamente curtos. Essas observações são importantes do ponto de vista comercial, tendo em consideração que o menor tempo de exposição ao elicitor pode otimizar o processo produtivo, reduzindo custos de produção.

O uso de pigmentos naturais conquistou elevada notabilidade mas sua produção é limitada, pois grandes quantidades devem ser obtidas para extração e purificação (MILECH et al., 2017). Métodos como cultivo hidropônico, aliados ao processo de elicitação são alternativas viáveis para a obtenção desses valiosos compostos.

As betalaínas são pigmentos vegetais nitrogenados derivados da L-tirosina, armazenados no vacúolo e empregados como corantes alimentícios, exibindo vasta gama de atividades biológicas desejáveis, incluindo antioxidantes, anti-inflamatórios, hepatoprotetores e propriedades anticancerígenas (GEORGIEV et al., 2008). Dividem-se em dois grupos estruturais, as betacianinas (compostos vermelhos ao vermelho violeta), as quais podem ainda ser classificadas como betanina, amarantina, gonferina e buganville (VOLP et al., 2009) e as betaxantinas (compostos de coloração amarela) (CAI et al., 2005).

Para as variáveis betanina e betanidina nos tecidos foliares (Figuras 6A-6B), o MeJa promoveu acréscimos a partir das 72 horas, expondo tendência crescente ao longo do tempo. Nos caules, comportamento crescente foi observado até as 48 horas, com picos nas médias para ambas variáveis (Figuras 6C-6B). Entretanto, após esse momento, declínio foi observado e o último período foi caracterizado pela exibição de valores abaixo das plantas não elicitadas.

Dados relatados por Keinänen et al. (2001) demonstram o papel do MeJa na indução de metabólitos secundários em diversas espécies de plantas. Contudo, as plantas respondem de diferentes maneiras aos elicitores, ou seja, certos metabólitos são ativados e os mesmos podem ser inibidos a depender de diversos fatores (LUCIANO et al., 2017). Segundo Chee et al. (2015) a concentração de 100 μ M de MeJa é a mais utilizada para induzir a produção de metabólitos secundários, porém a resposta em relação a esta concentração varia conforme o órgão exposto, bem como o tempo. E, ainda, essas respostas podem estar relacionadas a espécie. É possível que em *A. cruentus*, para incrementos mais expressivos dos referidos pigmentos sejam necessários maiores períodos de exposição. Provavelmente nos tecidos foliares de plantas tratadas com MeJa, tempo de exposição mais prolongado potencializaria o efeito do fito-hormônio, incrementando ainda mais os valores observados para betaninas e betanidinas.

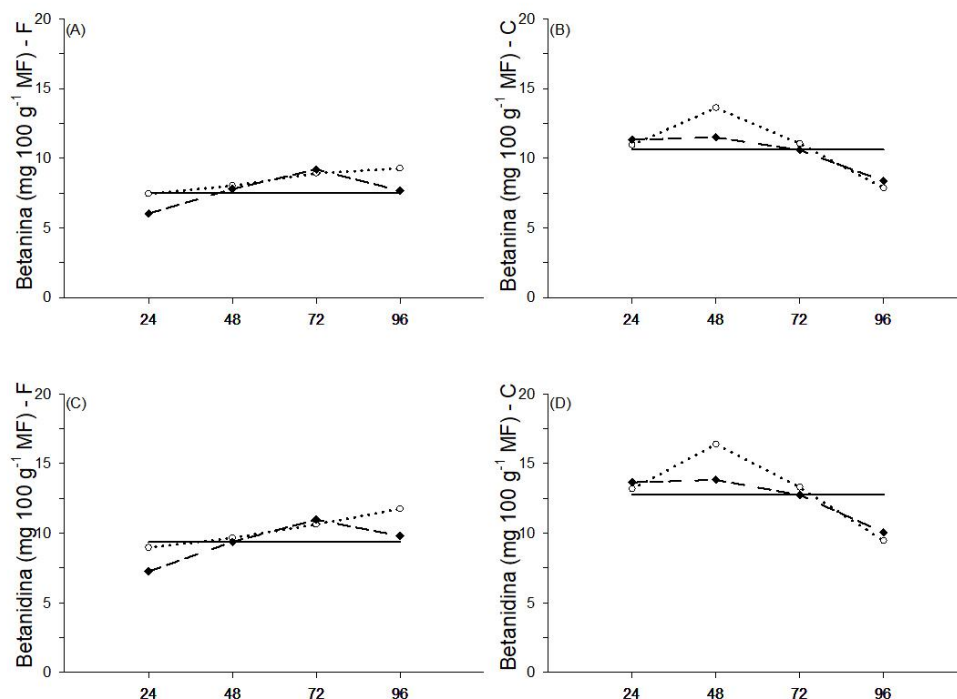


Figura 6. Teores de betanina (A-B) e betanidina (C-D) presentes em tecidos foliares e caulinares de plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 μM, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_i + u$. Faltou a legenda dos tratamentos no gráfico

Acréscimos na produção de betacianina foram obtidos por Bhuiyan; Adachi (2003) em *Portulaca* sp. com a aplicação de 0,1 μM de MeJa. Já, concentração equivalente a 100 μM afetou negativamente a biossíntese do pigmento supracitado, sendo os resultados inferiores ao controle. Em raízes de *Beta vulgaris*, níveis do elicitor entre 70 e 100 μM promoveram maiores conteúdos do pigmento betalâmico (SURESH et al., 2004). Essas observações indicam que a concentração de elicitores deve ser cuidadosamente considerada, a fim de evitar efeitos prejudiciais (CHEESEMAN, 2007; HUNG: YU:LIN, 2005).

Em relação ao teor de ambos os compostos, nas folhas das plantas submetidas ao AS houve queda logo nas primeiras 24 horas, exibindo retardo na promoção da síntese dos pigmentos em relação ao outro elicitor. Neste tratamento as médias superaram o controle somente 72 horas após início do processo de elicitação. Nos caules, apesar do acréscimo apresentado logo na primeira análise, a tendência foi de queda e, assim como o MeJa, os valores também finalizaram o período com médias inferiores ao controle.

Possivelmente, nas plantas expostas ao AS, a redução observada em ambos os pigmentos se deve às sínteses de flavonoides nas folhas e de amarantina e miraxatina nos caules, onde incrementos a partir do último momento de análise foram observados, coincidindo com os declínios anteriormente descritos.

Relatos demonstram a inibição da fotossíntese através do uso de AS, o que é traduzido em menor incorporação de carbono (MARCÍŃSKA et al., 2013). Dessa forma, disponibilidade inferior deste pode ter promovido a alocação de reservas para manutenção de processos referentes ao metabolismo primário. Essas observações são acentuadas pela queda obtida na atividade da FAL, a qual é também regulada pela quantidade de substrato disponível.

Os produtos podem ser degradados intracelularmente ou extracelularmente, e metabólitos degradativos podem ser transportados para dentro e para fora da célula e reutilizados tanto no metabolismo primário quanto no secundário (ROBERTS, 2007). Possivelmente, o declínio observado para estes compostos foi sua rápida degradação e alocação dos recursos para utilização em vias do metabolismo primário ou mesmo para a síntese de outros compostos do secundário, a exemplo de flavonoides os quais tiveram elevada produção nos períodos observados. É imprescindível ressaltar que há gasto energético envolvido na síntese das referidas moléculas e, naturalmente, a planta prioriza determinadas vias de produção. Também é necessário salientar que a eliciação constitui período de estresse (ZHAO et al., 2005) às plantas e podem ocorrer alterações em processos essenciais a exemplo da fotossíntese, reduzindo a quantidade de carbono incorporado para formação de esqueletos necessários ao normal funcionamento da planta, ressaltando assim, a possibilidade da dinâmica na formação e degradação das moléculas as quais possam gerar compostos básicos.

Os produtos finais dos processos regulatórios celulares resultam em metabólitos, que aumentam ou diminuem seu nível dependendo das mudanças ambientais e biológicas condições (FIEHN 2002).

Para os pigmentos amarantina e miraxantina (Figuras 7A-7C), nos tecidos foliares, observa-se que a resposta foi similar com uso de ambos elicitores. Os

picos para as duas variáveis ocorreram 48 horas após o início dos tratamentos, com posterior declínio seguido por tendência de elevação nas concentrações.

Nos tecidos caulinares, as semelhanças ocorreram somente para miraxatina (Figura 7B) e, apenas, após às 48 horas, com tendências de queda nos conteúdos para ambos os tratamentos. O MeJa exibiu retardo em relação ao AS na indução da molécula, com incrementos verificados somente a partir do segundo momento de avaliação.

Os resultados referentes à amarantina, novamente o MeJa promoveu atraso na obtenção de acréscimos, o qual ocorreu somente às 48 horas. De forma geral, o comportamento foi extremamente parecido ao observado nos tecidos foliares. Em relação ao AS, aumentos na concentração da molécula foram obtidos desde as primeiras 24 horas, com máximo sendo observado às 72 horas após aplicação dos fito-hormônios.

Resultados obtidos por Jim et al. (2016) demonstram o incremento promovido pelo MeJa na síntese de amarantina, tanto em folhas quanto em caules de plantas de *Amaranthus mangostanos*, e corroboram as respostas observadas no presente trabalho. De acordo com os autores, o fito-hormônio possui influência sobre a tirosinase, enzima envolvida na síntese dos pigmentos supracitados. Além disso, Raghavendra et al. (2012) verificaram aumentos no L-DOPA a partir do uso de MeJa sobre plantas de *Mucuna prurita*, evidenciando a essencialidade deste elicitador na indução dos pigmentos betalâmicos.

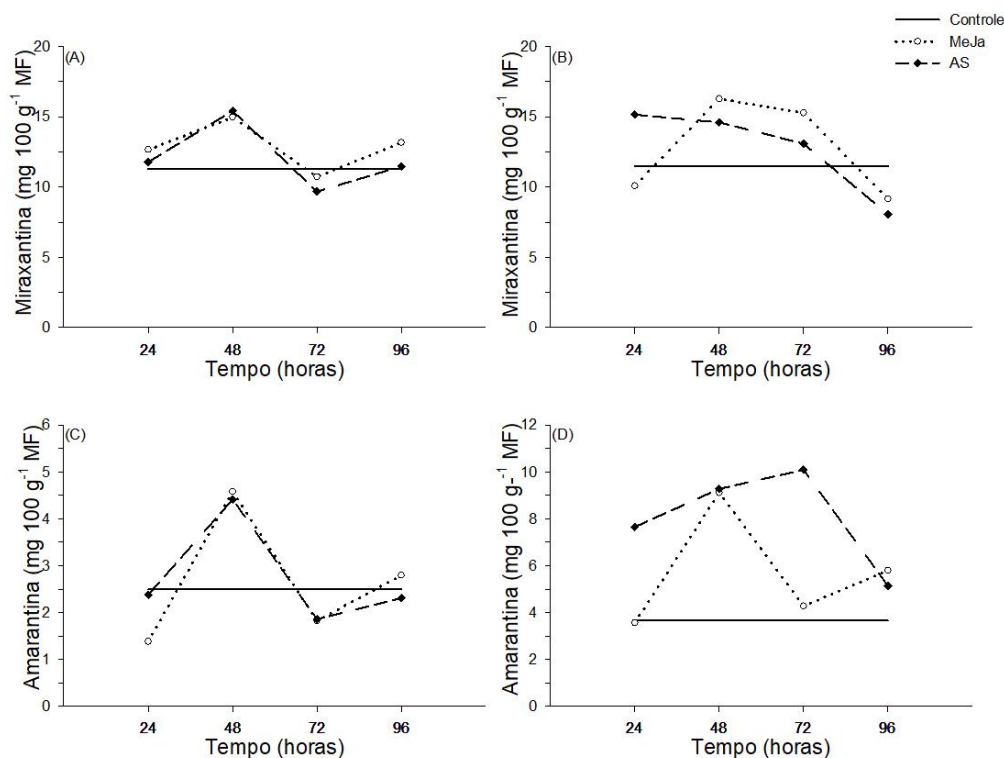


Figura 7. Teores de miraxantina (A-B) e amarantina (C-D) presentes em tecidos foliares e caulinares de plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 μ M, por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

Estudos realizados com vários genótipos e espécies do gênero *Amaranthus* verificaram que a pigmentação se deve predominantemente a duas betacianinas: amarantina, a forma mais abundante, e isoamarantina. Dessa forma, é possível que os elicitores tenham favorecido ainda mais a síntese dessas moléculas as quais ocorrem de forma preferencial na espécie em estudo.

Em *Amaranthus tricolor*, a aplicação de AS aprimorou o rendimento de vários compostos bioativos valorizados (KHANDAKER et al., 2011). Os efeitos do referido fito-hormônio também foram relatados por Rodrigues - Brandão et al. (2014), o qual promoveu a síntese de amarantina em *A. tenella*, com média de 14,6 mg de amarantina 100 g⁻¹ MF. Contudo, a dose empregada naquele trabalho foi quatro vezes superior à testada no presente estudo, indicando ser o *A. cruentus* mais suscetível ao acúmulo de amarantina mesmo com doses menores de AS. Essas respostas demonstram a eficiência da espécie em sintetizar compostos de interesse bioativo, denotando potencial uso para exploração comercial.

As betaxantinas são provenientes da condensação do ácido betalâmico com a dopamina ou seus derivados (SCHLIEMANN et al., 2001). Assim, os promissores efeitos obtidos para miraxantina podem estar relacionados à indução de intermediários em sua via biossintética. Moghadam et al. (2014) relataram incrementos na síntese de dopamina em plantas de *P. oleraceae* a partir da exposição ao MeJa. Dong et al. (2010) observaram maior atividade da enzima tirosina aminotransferase em *Salvia miltiorrhiza* submetida ao AS.

Resultados obtidos por Thiruvengadam et al. (2016) demonstraram que a elicitação com MeJa e AS foi capaz de regular a síntese de genes envolvidos na via de inúmeros compostos bioativos em plantas de *Brassica rapa* ssp. A partir dessas observações é plausível sugerir que em *A. cruentus* também ocorreu indução na expressão dos mesmos após o uso dos fito-hormônios.

MeJa e AS são reconhecidos por mediar repostas a extensa variedade de estresses. Assim, estão intimamente relacionados à geração de várias EROs (KAWNO; MUTO, 2000; BORSANI et al., 2001; MUNNÉ-BOSCH; PEÑUELAS, 2003), ocasionando estresse oxidativo temporário o qual possui efeito *primer* nos vegetais (JANDA et al., 2007). Esse impacto fomenta a síntese de inúmeros compostos antioxidantes e, portanto, a aclimação ao estresse (JANDA et al., 2007). A elevação obtida para estes pigmentos também pode ter sido ocasionada pela sinalização por espécies reativas de oxigênio.

O interesse na busca por novos antioxidantes naturais tem crescido há alguns anos pela relação existente entre o estresse oxidativo e doenças cardiovasculares, degenerativas, câncer e osteoporose (OZSOY et al., 2009). As plantas medicinais constituem importante fonte dos supracitados compostos, sendo capazes de desempenhar notável papel na prevenção e tratamento de diversas patologias. Apresentam ainda vantagens como ausência de toxidez, fácil disponibilidade e menos efeitos colaterais (DEY et al., 2013).

Existem diferentes métodos para avaliar a capacidade antioxidante de alimentos. Essa variedade ocorre pelo fato de nenhum deles por si só ser capaz de mensurar exatamente o potencial antioxidante total (EL-ZAEDDI et al., 2017). Apesar da notável aptidão medicinal de plantas de amaranto, estudos limitados têm sido relatados sobre a atividade antioxidante de seus extratos foliares e caulinares (OZSOY et al., 2009).

Apesar dos comportamentos opostos observados nos tecidos foliares de plantas tratadas com MeJa e AS, os métodos FRAP e DPPH (Figura 8A,8B,8C e 8D) mostraram-se eficientes para mensuração da capacidade antioxidante de ambos elicitores. Os incrementos obtidos para o MeJa ocorreram somente a partir das 48 horas e mantiveram-se acima do controle até o final do período. Para o AS, a elevação ocorreu a partir das 24 horas de análise, com pico no período posterior, decaindo e finalizando a análise com médias abaixo do controle. É possível inferir que este comportamento está associado à síntese de fenóis solúveis totais, variável a qual apresentou exatamente a mesma tendência à anteriormente relatada. O aumento na eliminação de radicais livres através do incremento de fenólicos induzidos por MeJA e AS foram também obtidos por Lucho et al. (2018).

Plantas de *Stevia rebaudiana* tratadas com os mesmos elicitores avaliados no presente estudo apresentaram atividade de eliminação de radicais notavelmente maior pelo método DPPH em relação ao controle (LUCHO et al., 2018), corroborando os dados exibidos.

A presença de compostos fenólicos em extratos vegetais contribui significativamente para o seu potencial antioxidante (DUDONNÉ et al., 2009). Os resultados observados estão de acordo com Katalinic et al. (2006), Wong et al. (2006) e Dudonné et al. (2009). E, ainda, o comportamento apresentado pela rotina, foi análogo ao exibido pelo FRAP caulinar do tratamento MeJa, indicando a atuação desta molécula na elevação da capacidade antioxidante. A correlação entre flavonoides e atividade antioxidante foi relatada por Li et al. (2015) em diversas espécies de amaranto, corroborando os resultados obtidos.

O tratamento com AS apresentou similaridades comportamentais entre algumas variáveis com capacidade antioxidante as quais podem ter colaborado para obtenção dessas respostas. Dentre elas, a glicina betaína, com tendência semelhante ao FRAP e DPPH e os pigmentos amarantina e miraxantina, especialmente no período compreendido entre 48 e 72 horas.

Entretanto, nos caules, para o DPPH, o comportamento diferiu do controle somente para as plantas tratadas com AS, onde foram verificados incrementos na capacidade antioxidante somente nas primeiras 24 horas. KHANDAKER; AKOND constataram estímulos à capacidade antioxidante em plantas de *A. tricolor* submetidas ao AS pelo método DPPH.

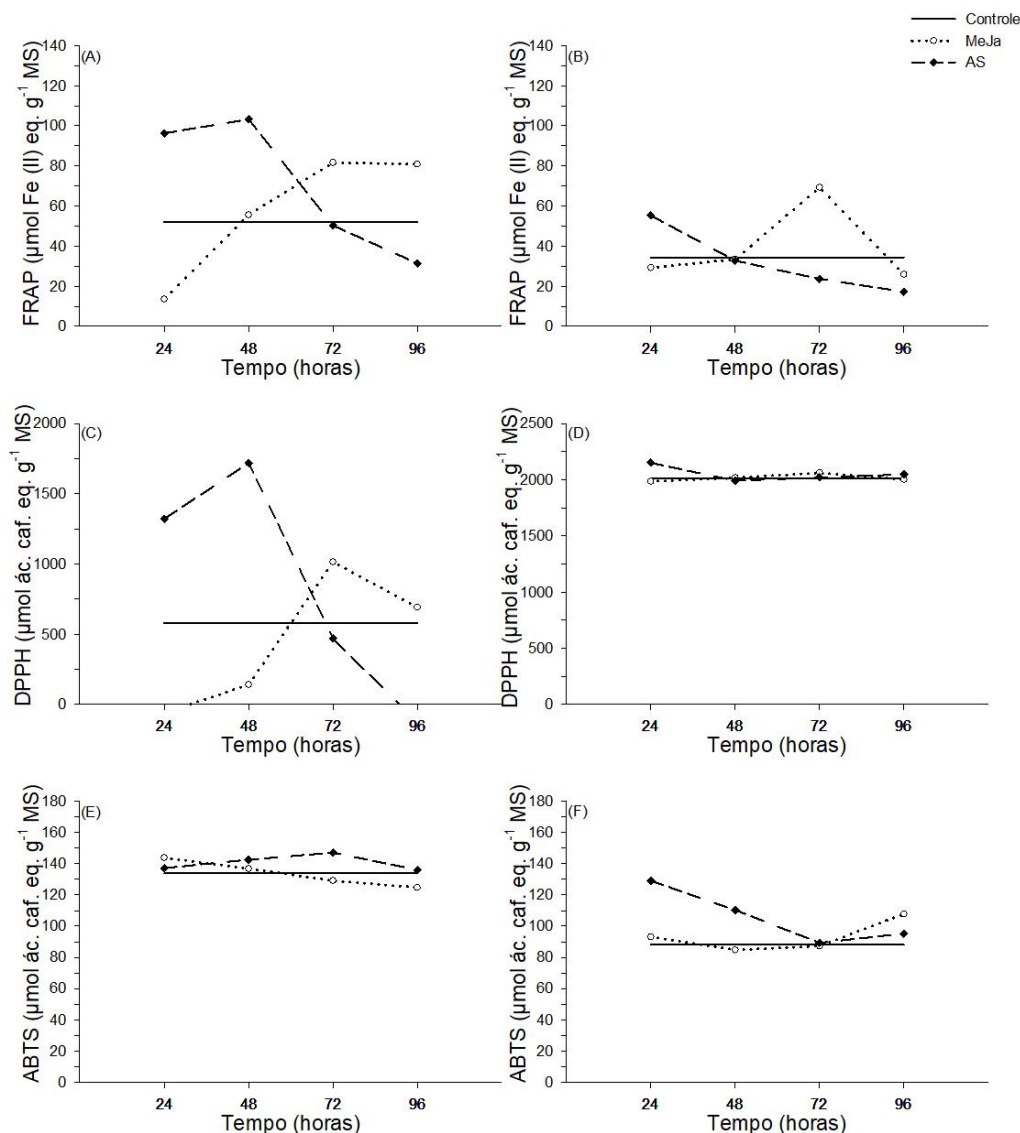


Figura 8. Capacidade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP (A-B), DPPH (C-D) e ABTS (E-F) em tecidos foliares e caulinares de plantas de *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, cultivadas em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), nas concentrações de 0 (controle) e 100 μM , por 24, 48, 72 e 96 horas. Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

O método ABTS (Figura 8E e 8F) foi mais eficaz em determinar a capacidade antioxidante nas plantas submetidas ao AS. As folhas apresentaram tendência crescente, chegando ao seu máximo às 72 horas após aplicação dos elicitores. Para o MeJa, nestes órgãos, o comportamento foi similar ao controle, sendo inferior a este no último no último período. Nos caules, para as plantas tratadas com AS, houve manutenção da capacidade antioxidante acima do controle até próximo às 72 horas. É possível que, novamente, a glicina betaína tenha contribuído pela manutenção deste comportamento, já que a síntese do

osmólito seguiu tendência similar. Os incrementos obtidos para o MeJa ocorreram também no mesmo período, apresentando tendência de crescimento. Possivelmente, maior período de exposição promoveria maiores médias a partir desta metodologia de avaliação da capacidade antioxidante.

3.4 Conclusões

Plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, realizam ajuste osmótico quando submetidas aos elicitores MeJa e AS em condições de hidroponia, apresentando incrementos significativos nos teores de compostos bioativos como betalaínas e flavonoides e possuem maior capacidade antioxidante.

4. CAPÍTULO IV - Respostas antioxidantes e do metabolismo de carboidratos em plantas de *Amaranthus cruentus*, cv BRS Alegria, submetidas à elicitação por metil jasmonato e ácido salicílico

4.1 Introdução

A ingestão de vegetais com propriedades funcionais aumentou devido à presença de moléculas bioativas, capazes de beneficiar a saúde do consumidor. Essas moléculas são conhecidas como fitoquímicos e podem ser encontradas principalmente em frutas e vegetais (MORENO-ESCAMILLA et al., 2017). O amaranto (*Amaranthus* spp., família *Amaranthaceae*, ordem *Caryophyllales*) é uma das culturas ainda pouco exploradas mas que vem ganhando recentemente atenção mundial por conter quantidade suficiente de nutrientes necessários ao desenvolvimento humano (GRAEBNER et al., 2004).

A espécie apresenta potencial produtivo de grãos, os quais possuem elevado teor de proteínas, contendo aminoácidos como a lisina, sendo ainda isentos de glúten. Essa característica torna a cultura nutricionalmente vantajosa, especialmente para indivíduos celíacos (GALLAGHER et al., 2004; DE LA ROSA et al., 2007). As folhas são ricas em vitamina C e pró-vitamina A, bem como em ferro, zinco e cálcio (YANG; KEDING, 2009). É resistente e pode ser cultivada sob diversas condições ambientais (CHIVENGUE et al., 2015).

Além das características anteriormente citadas, as plantas de amaranto apresentam compostos bioativos como ácido linoléico, taninos, alcaloides, flavonoides e betalaínas os quais detêm propriedades medicinais, possuindo atividades analgésicas, antiinflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, antimaláricas e antitumorais, dentre outras (KUMAR et al., 2014).

Os vegetais têm sido componentes de medicamentos ao longo da história humana (GOUDA et al., 2016). Plantas constituem importante fonte para a descoberta de novos fármacos e, inúmeros, são direta ou indiretamente derivados das mesmas (FARNSWORTH, 1988; NEWMAN et al., 2000). A maior parte destes compostos provém do metabolismo secundário vegetal; não possuem papel direto no desenvolvimento, mas são necessários, especialmente, na defesa contra estresses bióticos e abióticos. Essas moléculas possuem amplo emprego industrial, sendo utilizadas como fármacos, agroquímicos e aditivos alimentares (OKSMAN-CALDENTY et al., 2004).

Porém, o baixo rendimento destes compostos é o principal entrave para atender à demanda produtiva. Assim, são necessárias estratégias para estimular a produção de moléculas bioativas em plantas (REN; DAI, 2012). Nesse contexto, o aumento de metabólitos secundários por elicitação surge como uma das estratégias encontradas para suprir a exigência comercial (RAMAKRISHNA; RAVISHANKA; 2011).

O processo é atualmente foco de diversas pesquisas, constituindo o método mais eficaz para aumentar a produção destes compostos em espécies medicinais (THAKUR et al., 2019). O elicitor pode ser definido como uma substância que, quando aplicada em pequena quantidade, induz ou aprimora a biossíntese de determinada molécula (RADMAN et al., 2003).

Os hormônios são mensageiros químicos os quais afetam a capacidade da planta em responder às mudanças ocorridas em seu ambiente, interagindo com os tecidos alvo específicos, desencadeando, por fim, respostas fisiológicas em plantas. Alguns hormônios vegetais também têm sido usados como elicitores devido à sua capacidade de induzir a expressão genética de várias vias. Os mais comumente usados neste propósito são o metil jasmonato e o ácido salicílico (THAKUR et al., 2019).

A indução com determinado elicitor é acompanhada por extensa reprogramação das rotas do metabolismo primário, o qual fornece substratos

críticos para vias metabólicas secundárias (ZULAK et al., 2008). Como exemplo, pode-se citar a via dos fenilpropanoides, onde o aminoácido fenilalanina constitui o ponto de entrada na rota dos mesmos. Além disso, muitos cofatores essenciais envolvidos no metabolismo primário são necessários para a biossíntese de metabólitos secundários (BROECKLING et al., 2004). Tal perspectiva viabiliza nova área de pesquisa a qual pode impactar beneficamente a indústria farmacêutica e os conhecimentos existentes a respeito dos mecanismos de estímulos e obtenção de compostos alvo (SINGH; DWIVED, 2018).

Neste sentido, o sistema de cultivo hidropônico emerge como alternativa viável à intensificação do conteúdo de moléculas alvo. O método consiste no fornecimento de nutrientes dissolvidos diretamente na água de irrigação fornecida (MAGGINI et al., 2014) e dentre suas vantagens está a possibilidade de expor deliberadamente os vegetais aos elicitores, oportunizando os incrementos nas concentrações de metabólitos (BRECHNER et al., 2007; RAHIMI et al., 2012).

Espécies da família *Amarantaceae*, caracterizadas pela presença de betalaínas e flavonoides, já estão sendo utilizadas como modelos biológicos para estudos sobre a fisiologia do seu metabolismo secundário tanto na produção como no armazenamento e aproveitamento dessas moléculas naturais (KLEINOWSKI et al., 2014). No Brasil, a cultivar de *Amaranthus cruentus*, BRS Alegria, () foi desenvolvida com o propósito de atender à crescente demanda por esse produto, considerando seus benefícios à saúde bem como o alto valor agregado aos produtos funcionais (SPEHAR et al., 2003).

É vasto o número de estudos relativos aos efeitos de elicitores sobre o metabolismo secundário em diversas espécies, contudo são escassas as pesquisas capazes de elucidar o comportamento do metabolismo primário frente à elicitação. Assim, o presente trabalho objetiva avaliar o índice de pigmentos fotossintéticos, as capacidades de ajuste osmótico e antioxidante, além do conteúdo de carboidratos em plantas de *A. cruentus*, cv BRS Alegria, submetidas à aplicação dos elicitores metil jasmonato e ácido salicílico.

4.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no laboratório de nutrição de plantas pertencentes ao Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), município do Capão do Leão/RS, no período compreendido entre abril e maio de 2017. Foram utilizadas sementes da cultivar de *A. cruentus*, BRS Alegria, semeadas em bandejas de polipropileno contendo substrato tipo turfa fértil. Após 30 dias, as plântulas foram transferidas para sistema hidropônico, com raízes flutuantes, com solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950), meia força, por sete dias para aclimação ao método. Como controle, utilizou-se a solução nutritiva, anteriormente citada e, para o tratamento com elicitor, a mesma solução com acréscimo de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), ambos na concentração de 100 μ M.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4 (elicitores - ausência, MeJa e As x períodos de coleta – 24, 48, 72 e 96h), totalizando 12 tratamentos, compostos por três repetições, sendo cada unidade experimental representada por um vaso em hidroponia contendo cinco plantas de *A. cruentus*.

O índice de clorofila (Chl), de balanço de nitrogênio (NBI) e flavonoides (Flv) foram aferidos com auxílio de clorofilômetro (modelo Dualex FORCE-A, Orsay, France), a partir da média das leituras de quatro plantas por vaso em três vasos por tratamento (12 por tratamento), em folhas do terço médio. O índice de Flv é deduzido a partir de propriedades de absorção UV de flavonoides. Esta abordagem está relacionada à técnica de fluorescência utilizando dois comprimentos de onda de excitação: no comprimento de onda de UV (375 nm), absorvido por flavonoides, localizados principalmente na epiderme; e no comprimento de onda de referência que passa através da epiderme, sem ser absorvido antes de atingir a clorofila no mesofilo. A relação entre Chl/Flv permite a estimativa do índice de NBI (ABDALLAH, 2012).

A quantificação do aminoácido prolina foi determinada a partir da maceração de 200 mg de tecido foliar, seguindo metodologia proposta por Bates et al. (1973), com adição de 2,0 mL de ácido sulfossalicílico a 3%. O extrato obtido foi centrifugado por 10 minutos a 13.000g. Após, 1,0 mL do sobrenadante

de cada amostra recebeu 2,0 mL de ninhidrina ácida, 2 mL de ácido acético glacial e 2,0 mL de água destilada. Posteriormente, as amostras foram levadas ao banho-maria a 100 °C, onde permaneceram por uma hora, sendo resfriados em seguida. Sequencialmente, 4,0 mL de tolueno foram adicionados a cada amostra. O sobrenadante foi aspirado da fase aquosa, e a leitura procedida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 520 nm. A concentração de prolina foi determinada usando-se a curva padrão, preparada com concentrações conhecidas de prolina: 0; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 1,50 e 2,0 mg L⁻¹. Os valores obtidos foram expressos em mmol prolina g⁻¹ MF.

O potencial osmótico foi determinado com auxílio de osmômetro de pressão de vapor modelo 5600 VAPRO (Wescor, Logan, Utah, EUA). Amostras foliares e radiculares de aproximadamente 700 mg foram maceradas em tubos de polipropileno com capacidade para 2 mL com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, o extrato obtido foi centrifugado a 12.000g, a temperatura de 4°C durante 20 minutos. Utilizou-se alíquota de 10 µL para realização das leituras. Para conversão dos valores de mmol kg⁻¹ a potencial osmótico (Ψs), utilizou-se a equação de Van't Hoff em que $\Psi_s = -C \times 2,58 \times 10^{-3}$, na qual C é o valor de osmolalidade.

A atividade das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD), Ascorbato peroxidase (APX) e Catalase (CAT) foi determinada a partir da maceração de 200 mg de tecidos foliares na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizado em 2,0 mL do tampão de extração composto por: fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Após centrifugação a 12.000g por 20 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi coletado. O extrato obtido foi utilizado para a quantificação das proteínas em espectrofotômetro a 595 nm pelo método de Bradford (1976) e determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes, descrita a seguir.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). O meio de reação, composto por fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM, riboflavina 2 mM e amostra, foi iluminado por sete minutos, com lâmpada fluorescente de 20W. O controle, composto do mesmo meio de reação, não recebeu a amostra. O branco permaneceu no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima feito pela

equação: % DE INIBIÇÃO = (A560 amostra com extrato enzimático – A560 controle sem enzima) / (A560 controle sem enzima). Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em U mg⁻¹ proteína.

A atividade da APX foi determinada seguindo metodologia proposta por Nakano; Asada (1981), com monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM, foi incubado a 28°C e o decréscimo na absorbância observado por período de 1,5 minutos a partir do início da reação, com resultados expressos em μmol ASA min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Para avaliação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica foram macerados aproximadamente 300 mg de massa fresca de folhas. O tampão de extração foi composto por ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O homogenato foi centrifugado a 12.000g, durante 20 minutos e o sobrenadante obtido, transferido para tubos de polipropileno de 2 mL.

A atividade da CAT foi determinada conforme protocolo proposto por Azevedo et al. (1998) e o extrato enzimático analisado pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 1,5 minutos em meio de reação incubado a 34°C contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM. Os resultados foram expressos em μmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A quantificação do peróxido de hidrogênio seguiu metodologia descrita por Velikova et al. (2000). Constituíram o meio de reação: 0,7 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0), 1 mL de KI 1 M e 0,3 mL do sobrenadante coletado. Os tubos de ensaio foram levados a banho-maria a 30°C durante 10 minutos. As leituras ocorreram em espectrofotômetro a 390nm e a concentração de H₂O₂ expressa em μmol de H₂O₂ g⁻¹ MF.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, segundo Cakmak; Horst (1991). Foi adicionado ao sobrenadante 1 mL do meio de reação composto por 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10 % (p/v) de TCA sendo posteriormente incubados a 90°C, por 20 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo por 10 minutos, logo após a retirada do meio de incubação. As amostras foram em seguida lidas em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. O

TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário dos processos de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$, onde ξ : coeficiente de extinção = $1,56 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$, e b : comprimento ótico=1 cm. A peroxidação foi expressa em μmol de MDA g^{-1} MF.

Extração e quantificação de nitrato, sacarose, amido, açúcares solúveis totais (AST), aminoácidos solúveis totais (AAS) e polissacarídeos solúveis em água (PSA) foi realizada em folhas e raízes: aproximadamente 250 mg de massa fresca foram macerados em 8 mL de solução extratora M:C:W (metanol: clorofórmio: água milli-Q na proporção de 12:5:3) e acondicionados em frascos âmbar por 24 horas no escuro. Após, o volume foi completado para 10 mL, também com M:C:W, e o extrato centrifugado a 600g por 30 minutos. Posteriormente, 8 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos tipo Falcon, com a adição de 2 mL de clorofórmio e 3 mL de água milli-Q. Ocorreu novo processo de centrifugação, por 30 min a 600g, para separação de fases. A alíquota superior foi coletada e concentrada por evaporação até aproximadamente 50% do volume, em banho-maria a 30 °C por 24 horas com a finalidade de eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio presentes. O extrato obtido ao final foi posteriormente utilizado para quantificação de nitrato (CATALDO, 1975), sacarose (HANDEL, 1968), AST (GRAHAM; SMYDZUK, 1965) e AAS (YEMM; COCKING, 1955). O precipitado obtido da primeira centrifugação, após secagem em temperatura ambiente, foi ressuspenso em 8 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após 24 horas, as amostras receberam mais 2 mL do mesmo reagente citado, sendo centrifugadas a 600g por 30 minutos. A partir deste sobrenadante coletado quantificou-se PSA (GRAHAM; SMYDZUK, 1965). O precipitado anterior recebeu 10 mL de ácido perclórico (PCA) 30% e, após agitação por 30 minutos, nova etapa de centrifugação ocorreu nas mesmas condições supracitadas. A fase líquida obtida foi destinada à quantificação de amido (GRAHAM; SMYDZUK, 1965).

Para determinação dos teores de AAS, os extratos receberam 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M pH 5,0, 0,2 mL de reativo de ninhidrina 5% em metilcelusolve (eter monometílico de etilenoglicol) e 1 mL de KCN 2% (v/v) em metilcelusolve (preparada a partir da solução 0,01 M de KCN em água pura). Os tubos foram então encubados em banho-maria a 100 °C por 20 minutos. Após a

paralisação da reação em temperatura ambiente, foi acrescentado 1,3 mL de etanol 60%.

Para a quantificação de AST, além da alíquota diluída em água, o meio de reação foi composto por 1,5 mL de solução de antrona (0,15% em ácido sulfúrico concentrado). Decorridos 15 minutos, agitaram-se os tubos e incubou-se em banho-maria a 90 °C por 20 minutos. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de correção 0,9, para conversão em teores de amido. A determinação de PSA foi realizada por mesma metodologia executada para AST.

A avaliação do nitrato ocorreu através da adição de amostra à 200 µL de reagente salicílico (ácido salicílico 5% em H₂SO₄ concentrado). Após 20 minutos em temperatura ambiente, foi acrescentado ao meio 4,75 mL de NaOH 2N. Decorrido o resfriamento, os tubos foram agitados para posterior leitura.

A reação para a quantificação de sacarose contou com os extratos e 100 µL de KOH 30%, ocorrendo incubação em banho-maria por 10 min a 100 °C. Em seguida, adicionou-se 3 mL de antrona (0,15% em ácido sulfúrico 70%) e os tubos novamente permaneceram em banho-maria a 40 °C por 15 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (marca Biospectro, modelo SP-22), nos comprimentos de onda de 410 nm para nitrato, 570 nm para aminoácidos solúveis totais, e 620 nm para açúcares solúveis totais, amido, polissacarídeos solúveis em água e sacarose.

Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$), as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro por meio do Programa Estatístico R Studio e, em caso de interação significativa entre os fatores, as variáveis Y_{ijk} originais foram padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral de forma a manter sempre valores positivos, conforme equação abaixo:

$$Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$$

As pressuposições da ANOVA foram testadas:

- a) modelo aditivo
- b) independência dos erros (Σ_{ijk})
- c) normalidade dos erros (Σ_{ijk})
- d) variância dos erros homogêneos

Assim,

$$Y_{ijk} = u + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \Sigma_{ijk}$$

Y_{ijk} representa o valor da variável;

i , o índice do fator tempo;

j , o índice do fator tratamento;

k , o índice do número de repetições;

u , a média geral;

α_i , efeito do tempo i ;

β_j , o efeito do tratamento j ;

$(\alpha\beta)_{ij}$, o efeito da interação tempo por tratamento ij ;

Σ_{ijk} , resíduo do modelo A.

4.3 Resultados e Discussão

O índice de clorofilas apresentou aumento até 48 horas após a aplicação dos elicitores metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS), seguido de queda às 72 horas. Após este período, para o AS a queda no índice de clorofilas se manteve e para o MeJa houve novo pico de aumento até o ultimo período avaliado, 96 horas (Figura 1A). As clorofilas constituem indicador primordial do status fisiológico das plantas, sendo essenciais ao seu crescimento e adaptação aos mais variados ambientes (RÊGO; POSSAMAI, 2004).

Nas plantas tratadas com MeJa, tanto o índice de clorofila quanto o NBI (Figura 1A-1B), apresentaram comportamento análogo, salientando a íntima relação entre tais compostos, uma vez que, aproximadamente, 70% do nitrogênio contido nas folhas está nos cloroplastos, participando da síntese e da estrutura das moléculas clorofiladas (WOOD et al., 1993). Apesar deste fator, o NBI foi superior ao controle somente no último período de avaliação.

Os efeitos do referido elicitor sobre os pigmentos fotossintéticos não estão bem esclarecidos, havendo relatos tanto de acréscimos quanto de reduções nos conteúdos das moléculas em discussão. Neste trabalho, ambas respostas foram obtidas. A redução observada no período 48-72 horas pode ser corroborada por Jung (2004) e Anjum et al. (2011) os quais também verificaram diminuição do teor de clorofila pelo tratamento com MeJa. Em *A. thaliana*, o composto induziu

a expressão de genes da clorofilase, enzima relacionada à degradação do pigmento fotossintético (TSUCHIYA et al., 1999). Este efeito também pode ter ocorrido sobre as plantas de *A. cruentus*, explicando a queda observada. Este desempenho pode ainda ser atribuído aos eventos relacionados à senescência foliar aos quais o MeJa possui grande influência.

Por outro lado, as elevações observadas neste composto podem ter ocorrido devido a maior disponibilidade de nitrogênio, especialmente no último período. Mohamed; Latif (2017) obtiveram incrementos nos pigmentos fotossintéticos em plantas de soja submetidas a aplicação de MeJa. Esses resultados também foram constatados por Asma; Lingakumar (2015) e, provavelmente, essa tendência foi desencadeada por aumentos nos níveis de citocinina estimuladas pelo fitohormônio em questão (KOVAC; RAVNIKAR, 1994).

O AS foi capaz de manter o NBI acima do tratamento isento de elicitores em todos os períodos de avaliação. Ainda que tenha exibido queda nos dois primeiros momentos, o nitrogênio presente nas plantas foi capaz de sustentar a elevação apresentada pelo índice de clorofila, indicando que, neste tratamento, possivelmente ocorreu priorização dos processos fotossintéticos nas primeiras 48 horas após exposição aos elicitores. Khandaker et al. (2011) e Gharib (2006) também observaram resultados similares ao estudarem o referido pigmento com o uso deste elicitor em *Amaranthus tricolor* e manjerição doce, respectivamente. De acordo com Alvarez (2000), o AS possui efeito fisiológico direto no aprimoramento do processo fotossintético. O acréscimo obtido neste trabalho é, portanto, relacionado ao papel do AS sobre a fotossíntese, dada a importância das clorofilas durante essa etapa no ciclo vegetal.

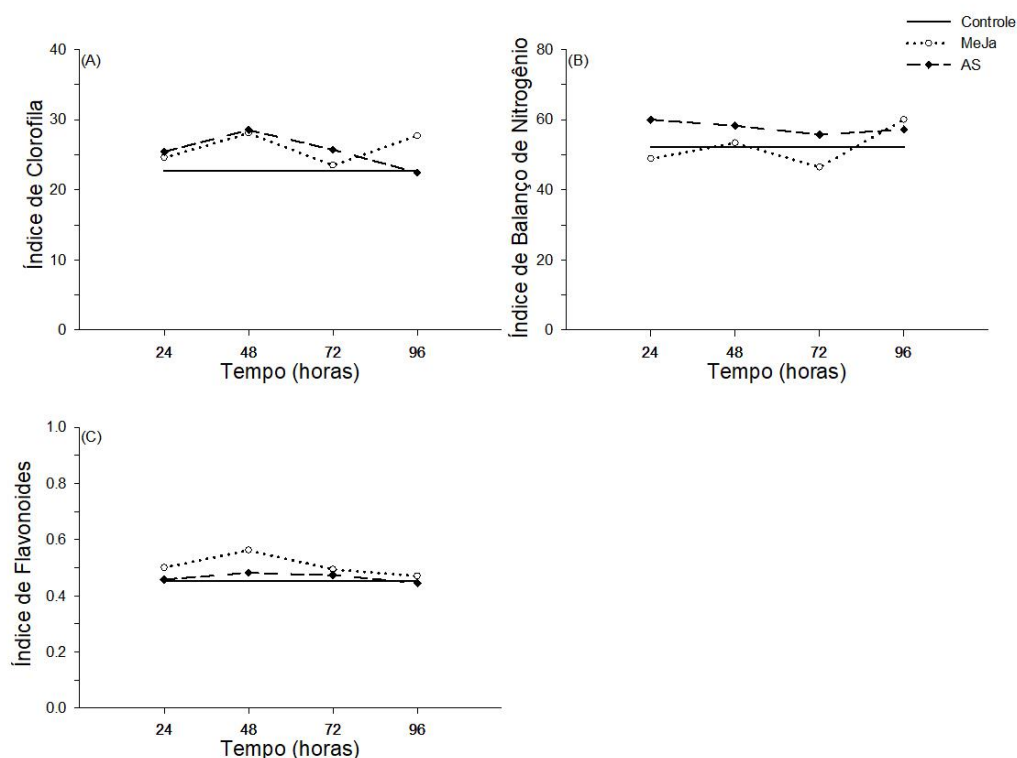


Figura 1. Índice de clorofila (Chl) (A), índice de balanço de nitrogênio (NBI) (B) e índice de flavonoides (Flv) (C) em plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \epsilon_{ijk}$.

A aplicação de AS pode causar estresse oxidativo nas plantas, que atua como processo de *primer*, melhorando a capacidade antioxidante das plantas e auxiliando a indução de síntese de compostos protetores e, portanto, a aclimação ao estresse (JANDA et al., 2007). Portanto, a produção dessas moléculas oxidantes pode ter ocasionado a degradação da clorofila observada por sua redução a partir da metade final da avaliação.

Nas plantas, a principal via biossintética dos flavonoides é a do chiquimato, o qual fornece fenilalanina não apenas para a produção de aminoácidos e proteínas, mas também para a formação de metabólitos secundários (STAMP, 2004). Portanto, ambos metabolismos podem competir pelos assimilados fotossintéticos disponíveis, havendo trocas na alocação (CARETTO et al., 2015).

Para esta variável (Figura 1C), somente o MeJa apresentou elevação no conteúdo deste metabólito, nas primeiras 48 horas, havendo posterior redução e estabilização até o final do período de estudo.

O AS não promoveu incrementos sobre esta molécula. Possivelmente, o efeito deste elicitor tenha promovido a síntese de outros compostos do metabolismo secundário, em detrimento ao apresentado aqui. Os flavonoides são gerados pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) sob condições ambientais de estresse (NAVARRO et al., 2006). Como citado anteriormente, a degradação da clorofila possivelmente ocorreu pela ação de EROs. Contudo, a atuação dessas moléculas não foi suficiente para permitir maior incremento no conteúdo flavonoídico.

Além disso, a ordem a qual pertence esta família não produz antocianinas, o que nos leva a concluir que a produção de flavonoides também possa ser prejudicada, já que a rota metabólica de biossíntese das mesmas é feita a partir do aminoácido fenilalanina (GANDIA-HERRERO et al., 2005).

Apesar de seus numerosos papéis no ciclo vegetal, o aminoácido prolina é mais conhecido por suas funções em condições de estresse. Altamente solúvel em água, esta molécula é capaz de conferir resistência a inúmeras espécies sob tensões osmóticas (AMINI et al., 2015). A prolina desintoxica o excesso de EROs, ajusta o equilíbrio osmótico celular, protege as membranas biológicas e estabiliza enzimas e proteínas (IQBAL et al., 2014).

Ambos elicitores, nos dois órgãos, apresentaram comportamentos opostos para a referida variável (Figura 1A-1B), exceto pelo período compreendido entre 48 e 72 horas nos tecidos radiculares, onde houve discreta elevação para os fitormônios testados.

Nas folhas, o MeJa promoveu drástica redução no conteúdo deste osmólito, chegando a ficar abaixo do controle. Nas últimas 24 horas foi revelada tendência de elevação do teor de prolina nas plantas tratadas com o referido elicitor. Possivelmente este comportamento esteja associado a alocação energética de compostos nitrogenados para síntese de outras moléculas envolvidas no ajustamento osmótico. É possível que a redução também tenha sido ocasionada pela diminuição no NBI anteriormente discutida, especialmente no período entre 48-72 horas. A prolina pode ser sintetizada a partir de arginina/ornitina em adição ao glutamato, com a ação da enzima ornitina

aminotransferase (OAT) sendo chave neste processo. Infere-se que neste período possa ter ocorrido forte inibição na atividade da mesma, com posterior indução no período final. Cao et al. (2012) relacionaram o aumento no acúmulo deste osmólito em nêspira ao incremento na atividade de OAT induzida por MeJa.

Até as 72 horas, o AS apresentou tendência idêntica nos órgãos estudados, com valores crescentes para síntese de prolina. Contudo, nas folhas, a partir daquele período, queda acentuada foi obtida. Nas raízes, a concentração exibida seguiu até o momento final de análise. Pode-se inferir que as raízes sofreram mais com o estresse e, a síntese do aminoácido em questão, auxiliou a mitigar os efeitos ocasionados pelos distúrbios gerados, em tentativa de realizar o ajuste osmótico. Nazarli et al. (2014) também observaram incrementos nos teores de prolina e açúcares solúveis totais ao investigarem o efeito do AS em plantas de camomila. El - Tayeb et al. (2006) verificaram indução, através do AS, no aumento de aminoácidos em caules e folhas de plantas de girassol estressadas com Cu. Os mesmos autores também relataram efeitos positivos deste fitohormônio em cevada sob estresse de NaCl (EL - TAYEB, 2005). Estes resultados indicam o papel regulatório do AS na síntese de aminoácidos em plantas sob situação de estresse. Essa relação corrobora os resultados descritos neste trabalho, já que a prolina pertence ao referido grupo de moléculas.

A associação entre o status hídrico e a elicitação foi relatada em pesquisas muito limitadas (HASSINI et al., 2017). O ajuste osmótico inclui o acúmulo de solutos compatíveis em uma célula, ocasionando a diminuição do potencial osmótico, que por sua vez atrai a entrada de água, mantendo a pressão de turgor (MOHAMED; LATIF, 2017).

No presente estudo, observamos que os elicitores promoveram alterações na variável. Os resultados exibidos pelo MeJa para o potencial osmótico, especialmente a partir das 48 horas, foram inerentes aos expostos para a prolina, indicando a estreita ligação existente entre ambas variáveis.

Para o AS, nos tecidos foliares, a tendência observada também foi muito similar ao obtido para a prolina, evidenciando o papel deste osmólito no ajuste osmótico das plantas. Nas raízes, o desempenho de ambos elicitores também foi semelhante, exceto no período compreendido entre 48 e 72 horas. É importante salientar que neste trabalho as plantas foram cultivadas em sistema

hidropônico e, portanto, as raízes estavam em constante contato com a solução nutritiva e os elicitores, o que pode ter intensificado a instabilidade na síntese e realocação dos compostos avaliados. Além disso, outros componentes do metabolismo podem ter influído sobre os dados obtidos para o potencial, a exemplo de alguns carboidratos.

Fisiologicamente, o amaranto exibe alta capacidade de ajuste osmótico para garantir o funcionamento de seu metabolismo sobre condições estressantes (LIU; STÜTZEL, 2002). Essa informação sugere tendência natural da espécie em adaptar-se a situações adversas, o que foi facilitado pela presença dos elicitores.

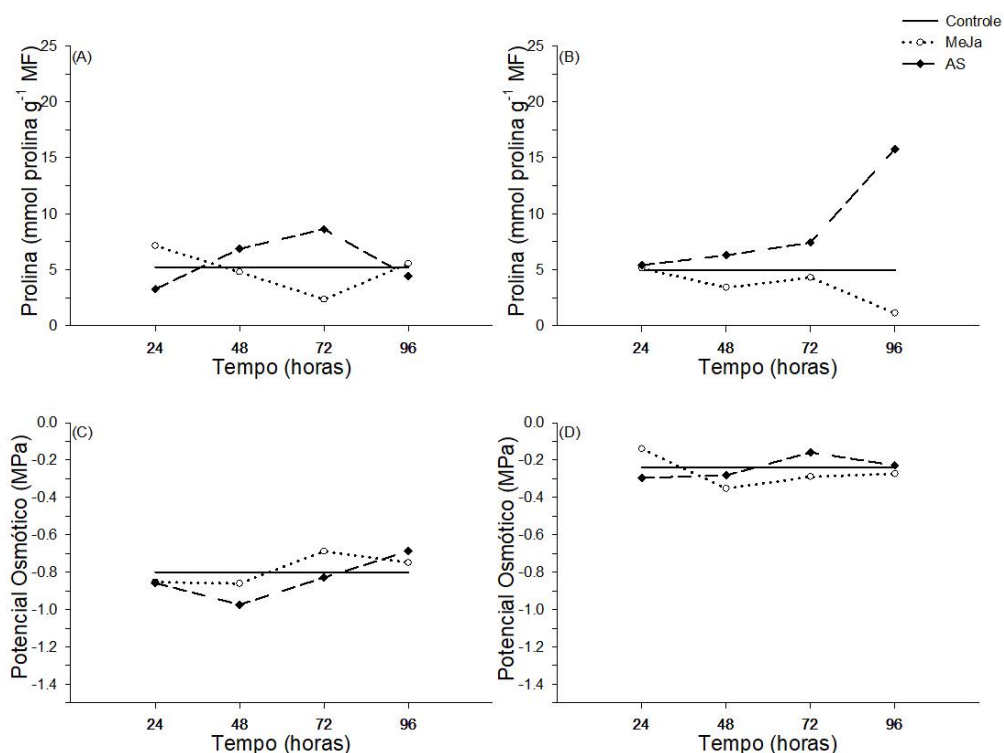


Figura 2. Teor de prolina (A e B) e potencial osmótico (C e D) presentes em tecidos foliares e radiculares de plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

As plantas desenvolveram variedade de respostas de defesa contra ambientes desfavoráveis, o que inclui a própria exposição aos elicitores (TAN et al., 2004). O alívio dos danos oxidativos e o aumento da resistência a estresses,

em estágios críticos de crescimento da planta, são frequentemente correlacionados com eficiente sistema antioxidante (CHEN et al., 2006; BROWSE, 2009). O sistema de desintoxicação enzimático inclui enzimas como a Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) (GILL, 2010). A SOD é a mais eficaz, estando presente em todos os compartimentos subcelulares propensos a estresse oxidativo mediado por espécies reativas de oxigênios (EROs) (GILL, 2010).

A produção aprimorada de EROs pode atuar positivamente para sinalizar ou induzir mecanismos protetores, tais como acumulação de prolina, açúcares solúveis, tocoferóis e compostos fenólicos, sendo a indução dessas defesas mediado pelos fitohormônios MeJa e AS (NAZARLI et al., 2014).

Os elicitores promoveram grandes mudanças no metabolismo antioxidante das plantas de *A. cruentus*. Para a SOD, os tratamentos apresentaram comportamentos opostos. Para o MeJa, o pico de atividade desta enzima ocorreu as 48 horas com posterior queda e estabilização. Já o AS, exatamente no mesmo momento demonstrou elevação na atuação do referido mecanismo de eliminação de EROs, sendo crescente até o final da avaliação.

Em relação a APX, respeitadas as diferenças de médias, ambos elicitores apresentaram comportamento semelhante, com marcante redução nas primeiras 24 horas de análise, sendo os valores observados inferiores ao das plantas do tratamento controle. A partir deste ponto, os dois elicitores elevaram gradualmente a atividade da referida enzima, sendo os picos para MeJa e AS apresentados no período de 72 horas, com o AS apresentando médias acima do controle já no período de 48 horas. O momento final de avaliação foi marcado por novo decréscimo na ação enzimática da APX em ambos tratamentos.

O MeJa apresentou tendência irregular para CAT, sendo sua atividade abaixo dos níveis do tratamento controle, igualando-se a este tratamento somente no período final de avaliação. Assim como para a APX, o AS novamente ativou a enzima a partir do período de 48 horas, obtendo o máximo de atividade as 72 horas com posterior redução.

Resultados obtidos por Norastehnia; Nojavan-Asghari (2006) demonstraram que a aplicação de MeJa foi capaz de elevar a atividade de enzimas antioxidantes em plantas de milho. A mitigação dos efeitos das EROS

pelo mesmo elicitor foi igualmente relatada em morango sob estresse hídrico (GINÉ-BORDONABA; TERRY, 2015). Contudo, no presente trabalho, a enzima SOD foi a mais responsiva para este fitohormônio, apresentando maior atividade. Ao final do período de avaliação, incrementos, acima das médias do controle, nas ações enzimáticas de APX e CAT foram observados. É possível que, com maior tempo de elicitação, ambas demonstrassem estímulos mais significativos em seus comportamentos.

CAT e APX são as principais enzimas envolvidas na remoção de H_2O_2 em plantas e suas atividades podem ser inibidas por AS. Esse impedimento desencadeia aumentos nos níveis de H_2O_2 , induzindo respostas adaptativas nas plantas (KLESSIG; MALAMY, 1994; FERRARI, 2010;). Porém, este efeito foi observado somente no último momento de avaliação, com a queda na atividade de ambas enzimas e nas primeiras 24 horas, para APX, apenas. Gondor et al. (2016) também verificaram aumento na atividade enzimática frente ao AS.

As respostas exibidas pelas plantas após indução dos elicitores estão, possivelmente, relacionadas a outros mecanismos de eliminação de EROs a exemplo da atuação de pigmentos com propriedades antioxidantes e outras importantes moléculas presentes no metabolismo secundário de plantas estimuladas. Moharramnejad et al. (2019) verificaram que a exposição de *Stevia rebaudiana* ao MeJa e AS diminuiu significativamente o desempenho da CAT.

As plantas são dotadas de efetivo sistema para controlar a ação deletéria destes radicais produzidos em excesso em condições de estresse, sendo possível observar expressão diferencial de algumas enzimas do metabolismo antioxidante em várias espécies vegetais (MORO et al., 2015).

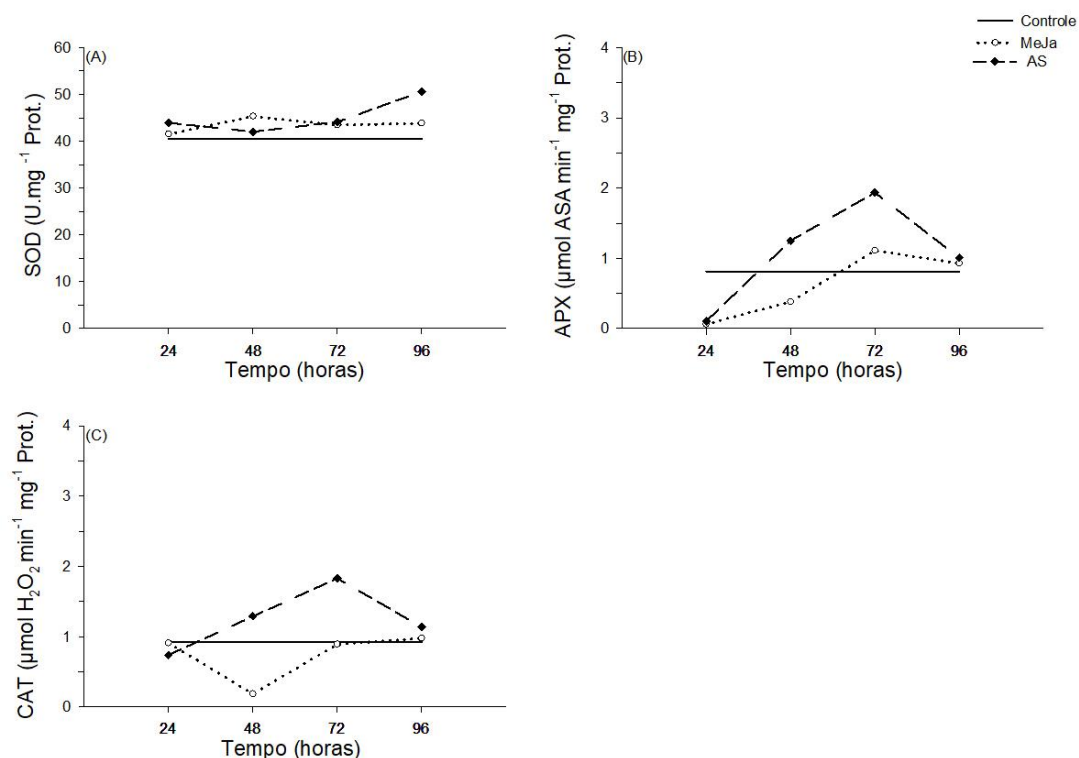


Figura 3. Atividade das enzimas Superóxido dismutase (A), Ascorbato peroxidase (B) e Catalase (C) em plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

As principais consequências da produção descontrolada de EROs nas células, são os danos aos ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, que podem comprometer gravemente as funções celulares (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).

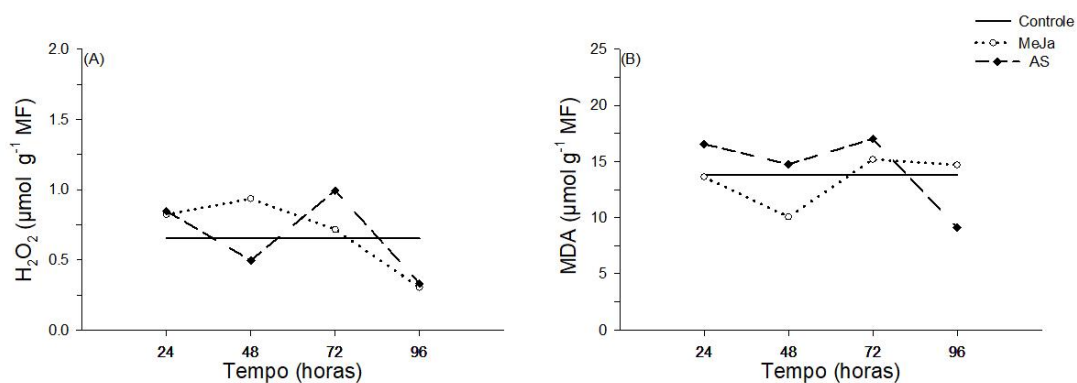


Figura 4. Conteúdo de H_2O_2 (A) e Peroxidação Lipídica (B) em plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

Para o H_2O_2 (Figura 4A), o comportamento dos elicitores foi similar no primeiro e último momentos de avaliação. As 24 horas, ambos elevaram o conteúdo desta molécula, sendo superiores ao tratamento controle. O MeJa apresentou queda gradual e, somente as 96 horas, ficou abaixo do controle. Para o AS, a indução na síntese desta molécula foi mais instável, com momentos alternados de picos e posteriores quedas, sendo o máximo valor obtido as 72 horas.

A APX e outras peroxidases, responsáveis por eliminar o H_2O_2 , apresentam alta afinidade pela molécula, eliminando-o mesmo quando em baixas concentrações. Já a CAT possui baixa afinidade, sendo ativa somente quando este está em altas concentrações, portanto, quando o estresse é mais severo. Neste trabalho, ambas enzimas foram inibidas pela presença do MeJa. E, de acordo, com os dados observados para a peroxidação lipídica (Figura 4B), os quais permaneceram abaixo das plantas do controle em grande parte do período, pode-se inferir ausências de efeitos prejudiciais, mesmo com a ínfima atividade enzimática. Esse contexto indica que outros compostos foram responsáveis pela proteção celular, como flavonoides os quais apresentaram elevação nos seus índices a partir do primeiro momento de avaliação após exposição das plantas aos elicitores.

O AS é reconhecido como sinal regulador na mediação de respostas a diversos tipos de estresse. Neste sentido, sua ação está intimamente relacionada a geração de várias EROs (KAWNO; MUTO, 2000; BORSANI et al., 2001; MUNNÉ-BOSCH; PEÑUELAS, 2003). Como explanado anteriormente, o

AS pode ocasionar estresse oxidativo temporário o qual possui efeito *primer* nos vegetais (JANDA et al., 2007). De forma similar, o MeJa também detém essa habilidade, incitando a produção de inúmeros compostos antioxidantes e, portanto, a aclimação ao estresse (JANDA et al., 2007). Segundo Kaur et al. (2014), a adaptação a condições adversas é obtida pela manutenção de níveis baixos de H_2O_2 .

O comportamento da peroxidação lipídica nas plantas submetidas ao AS foi análogo ao apresentado para o H_2O_2 , indicando que a ação enzimática não foi eficiente na redução dos efeitos deletérios das EROS. As respostas obtidas para esta variável podem ser corroboradas por Ali et al. (2007) os quais observaram estresse oxidativo em plantas de *Panax ginseng* tratadas com os mesmos elicitores estudados no presente trabalho. Contudo, às 96 horas, ocorreu declínio na ação enzimática de APX e CAT bem como nos teores de peróxido e peroxidação. Possivelmente essa mitigação tenha sido ocasionada por moléculas do metabolismo secundário com grande capacidade antioxidante, ativadas pela sinalização por AS ocorrida nas primeiras horas de indução dos tratamentos.

Para o AS, onde foi observada elevação nos teores de H_2O_2 no período compreendido entre 48 e 72 horas, pode ter havido ativação da prolina por meio desta molécula sinalizadora. É interessante observar que a queda nos teores dessas EROs coincidiu com a diminuição nos teores do osmólito. Podemos inferir que, pelo fato de a prolina ser precursora de pigmentos betaxantínicos (MINALE et al., 1965), ocorreu formação dessas moléculas as quais atuaram como antioxidantes.

Além disso, em dados anteriormente apresentados, a partir das 48 horas o índice de clorofila em plantas tratadas com AS decaiu. Neste momento, também foi observado incremento nos teores de H_2O_2 e como inferido, pode ter ocorrido degradação neste pigmento. A posterior queda no índice de clorofila manteve-se porque esqueletos nitrogenados podem ter sido realocados para síntese de betaxantinas.

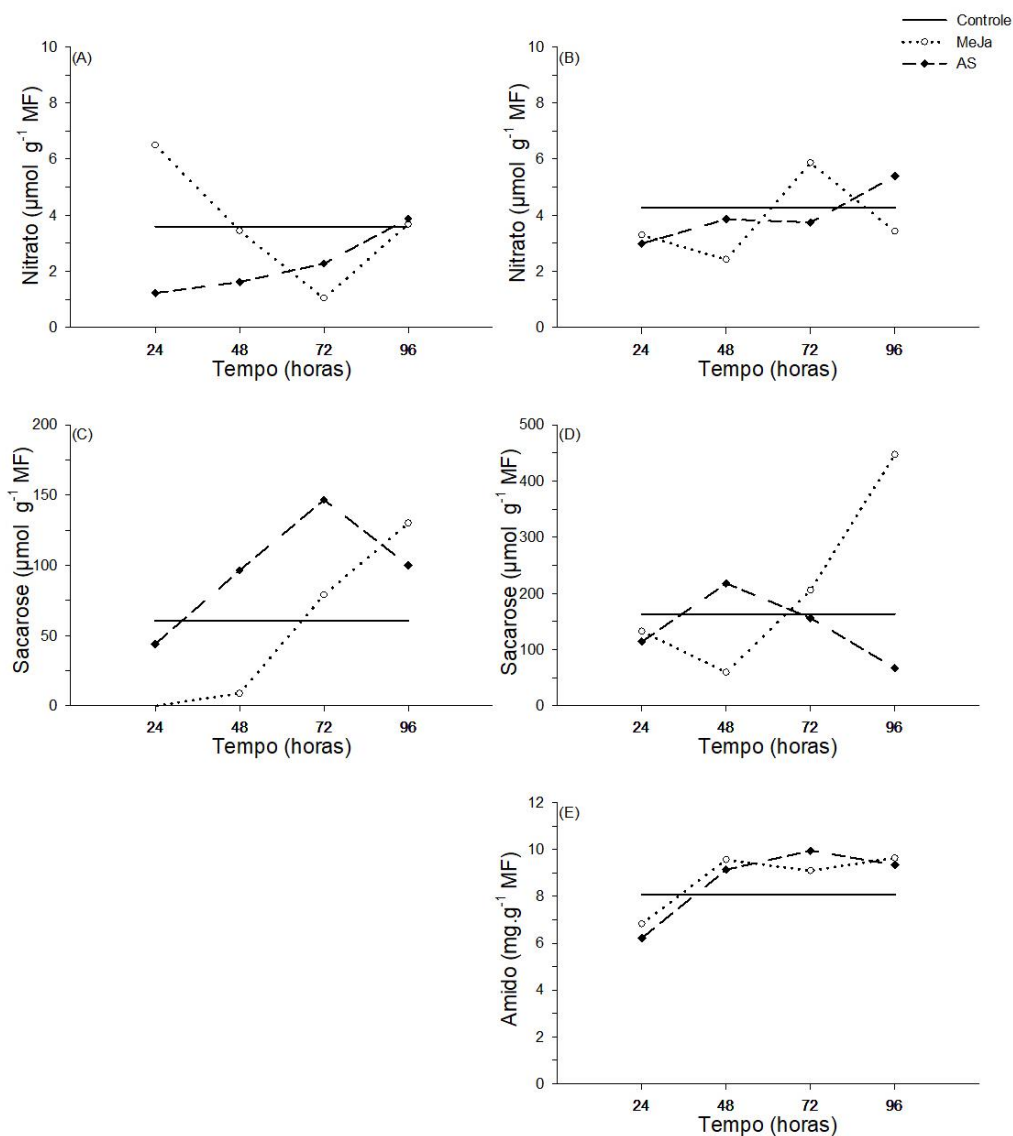


Figura 5. Teores de nitrato (A e B), sacarose (C e D) e amido (E) presentes em tecidos foliares e radiculares de plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média comparada dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

Dentre os elementos químicos essenciais, o nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas, pois atua diretamente influenciando o crescimento vegetal, e está relacionado ao metabolismo, sendo componente de biomoléculas essenciais tais como ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas, coenzimas e enzimas, além de participar da síntese de vitaminas e hormônios (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). É considerado como o nutriente mais crítico para a produtividade agrícola (BORGES et al., 2007).

As formas preferenciais de absorção deste nutriente são N - nítrico e amoniacal, sendo as mais abundantes na solução do solo e pela qual elemento pode ser absorvido e metabolizado pelos vegetais (WAFA et al., 2019). A absorção de nitrato é maior em pH ácido, enquanto a de amônia, ocorre em valores próximos a neutralidade, decrescendo com o aumento da acidez. Em condições normais de solo, a forma de nitrato é frequentemente dominante por ser a forma iônica de maior liberdade para movimentação em direção às raízes das plantas (COSTA et al., 2008).

Para o nitrato, nos tecidos foliares (Figura 5A), o efeito mais marcante foi obtido pelo tratamento com MeJa. As plantas submetidas a este elicitor apresentaram elevado acréscimo logo nas primeiras 24 horas de avaliação. Posteriormente, os valores decaíram, ficando abaixo do controle. A partir das 72 horas, novo incremento nos teores de nitrato foram exibidos.

O comportamento observado, especialmente a partir das 48 horas, também é muito semelhante ao obtido para o índice de clorofila, NBI, AAST e prolina, parâmetros anteriormente discutidos. Esses resultados evidenciam a clara relação existente entre as variáveis e indicam que, nas plantas de *A. cruentus*, o MeJa exerce forte influência sobre compostos nitrogenados. Esses dados podem ser corroborados por Wu et al. (2018) ao estudarem o efeito deste elicitor sobre plantas de arroz. Gomez et al. (2010) também verificaram a capacidade do referido elicitor em estimular a exportação de N a outros órgãos, bem como a conversão deste em aminoácidos.

As plantas utilizam suas reservas de carbono para assimilação do NO_3^- , para reduzi-lo a NH_4^+ , forma utilizada na incorporação de nitrogênio nas estruturas de carbono. Enzima chave nesse processo, a nitrato redutase (NR), atua no primeiro passo da redução do nitrogênio nítrico. Em contrapartida, a assimilação de nitrogênio amoniacal nas plantas ocorre através glutamina sintetase (GS), a qual catalisa a conversão do aminoácido glutamato (GLU) em glutamina (GLN) (MIFLIN; HABASH, 2002). O metabolismo do carbono e do nitrogênio estão intrinsecamente interligados. Os esqueletos carbonados usados na biossíntese de aminoácidos são oriundos, principalmente, da respiração (glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e rota das pentoses fosfatadas) (MARENCO; LOPES, 2005).

Nas plantas tratadas com AS, ocorreu efeito similar entre os dois órgãos estudados, porém o declínio mais pronunciado foi obtido nos tecidos foliares. O fitohormônio reduziu drasticamente o teor de nitrato, sendo suas médias inferiores ao controle em todos os períodos avaliados, exceto no último, onde ele igualou-se aos outros dois tratamentos. Essa dinâmica indica que, à medida que aumentou a absorção pelas raízes, este elemento foi sendo translocado aos órgãos superiores.

De acordo Cheng et al. (2018), níveis mais altos de AS podem inibir o sistema de captação de nitrato e causar retardo no crescimento e desenvolvimento das plantas. Glass (1974) observou redução na absorção de íons em cevada (*Hordeum vulgare* L. cv. Karlsberg), corroborando os eventos apresentados no presente trabalho. Rajjou et al. (2006) também relataram resultados semelhantes sobre a germinação de sementes e o estabelecimento de plântulas de *Arabidopsis thaliana*.

A diminuição da atividade da nitrato redutase em plantas estressadas pode ser considerada adaptação bioquímica para conservação de energia, interrompendo a assimilação de nitrato. Possivelmente, o aumento gradual observado nos teores deste composto em plantas submetidas ao AS é a possível aclimação ao distúrbio ocasionado pela aplicação do fitohormônio. No período final de avaliação foram observadas reduções nos teores de peróxido e peroxidação lipídica, indicando possível estabilização do status redox nas plantas. O aumento na absorção de vários nutrientes, incluindo o NO₃ e a ativação da NR, em condições normais, está bem estabelecido (HAYAT et al., 2005), confirmando as suposições apresentadas.

O particionamento de recursos é de particular interesse pois as mudanças na divisão entre os órgãos podem fornecer informações sobre padrões variáveis de investimento de recursos em diferentes finalidades da planta (BABST et al., 2004). Os açúcares, devido à sua função reguladora, afetam todas as fases do ciclo vegetal e, através da interação com os fitohormônios, controlam os processos de crescimento e desenvolvimento (WIND et al., 2010; STOKES et al., 2013).

A literatura demonstra que alguns açúcares solúveis desempenham papéis semelhantes em eventos associados ao metabolismo de plantas estressadas (GILL et al., 2001; ALMODARES et al., 2008), sendo a sacarose e

a glicose substratos para a respiração ou atuando como osmólitos para manter a homeostase celular (GUPTA; KAUR, 2005). A frutose, por sua vez, parece estar vinculada à síntese de metabolitos secundários (ROSA et al., 2009).

A sacarose é o principal carboidrato exportado das folhas fonte para os tecidos dreno na maioria das plantas (ONO et al., 2003). Para esta variável, tanto nas folhas quanto em raízes (Figura 5C-D), o MeJa demonstrou elevada similaridade, com marcante elevação nas concentrações deste açúcar, especialmente a partir das 48 horas. Já o AS exibiu intenso estímulo à síntese do mesmo com declínio nas últimas 24 horas nos tecidos foliares e, nos radiculares, a queda foi observada logo a partir das 48 horas.

A sacarose desempenha papel central no metabolismo das plantas, sendo fonte crítica de geração de energia. *Pools* de carboidratos como sacarose, glicose e frutose foram esgotados mais rapidamente em células tratadas com elicitores, indicando maior exigência de carbono e energia para apoiar o metabolismo secundário (ZULAK et al., 2008). Possivelmente a ativação dessas vias nas plantas tratadas com MeJa tenha ocorrido mais rapidamente, em relação ao AS, fato que explica a drástica redução obtida para a sacarose na etapa inicial de avaliação, em ambos os órgãos. Essa observação pode ser corroborada pela baixa peroxidação lipídica obtida nas primeiras 48 horas para o tratamento com este elicitor, como anteriormente discutido. O mesmo foi verificado para o AS, ainda que a mobilização energética através dessa molécula não tenha sido tão intensa quanto nas plantas submetidas ao MeJa.

O metabolismo de partição e acúmulo de sacarose é vital em todas as fases do ciclo de vida vegetal e sua utilização como fonte de energia e de carbono requer sua hidrólise (LEITE et al., 2009).

A aplicação de elicitores como MeJa e AS é capaz de mimetizar o ataque de patógenos na planta e, portanto, os efeitos esperados no metabolismo são semelhantes. Nesse tipo de estresse, uma série de eventos é iniciada, desencadeando rápidas mudanças como declínio na fotossíntese, aumento na respiração, fotorrespiração e na atividade enzimática de invertases (BERGER et al., 2007). As invertases quebram a sacarose em hexoses e, assim, disponibilizam às células carbono e energia para o processo de respiração, bem como energia para a síntese de numerosos compostos diferenciados (LEITE et al., 2009). As invertases podem, ainda, estar envolvidas no transporte de

sacarose a longas distâncias por criar o gradiente de concentração de sacarose entre os sítios de carregamento e descarregamento do floema, revelando função fundamental na partição dos fotossintetizados entre armazenamento e crescimento (ESCHRICH, 1980). Essa cascata de eventos pode explicar a diminuição observada nos teores de sacarose e AST para os elicitores em ambos órgãos avaliados.

A elevação nos teores de sacarose obtida para o AS pode estar relacionada ao aumento na eficiência de carboxilação, sobre a qual elictor possui influência. Esses dados também podem ser corroborados pelo incremento no teor de clorofilas nos momentos iniciais de avaliação. A queda observada possivelmente está ligada ao aumento na atividade de invertases.

A biossíntese do amido é estimulada quando a acumulação de sacarose excede a capacidade de armazenamento da folha ou a demanda pelos tecidos dreno (WANG et al., 2015). Para este carboidrato, nos tecidos foliares, não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos (dados não exibidos). Nas raízes (Figura 5E), os efeitos dos elicitores, nas primeiras 48 horas, foram semelhantes. No primeiro momento de avaliação, queda no conteúdo foi observada, com valores permanecendo abaixo do controle. Posteriormente, os elicitores promoveram incrementos nos valores. O AS manteve tal tendência até as 72 horas, ao contrário do MeJa. No momento final de observação, novamente os fitohormônios demonstraram tendências opostas, mas, em grande parte do tempo de avaliação, as médias superaram o controle. Esses resultados são interessantes porque podem servir como ferramenta para promover a elevação dos teores de amido em espécies de difícil manipulação genética.

Vários metabólitos que desempenham papéis bem estudados do metabolismo primário podem desempenhar funções defensivas (SCHWACHTJE; BALDWIN, 2008). Reordenamentos no metabolismo do amido podem ser observados em plantas expostas a curtos períodos de estresse oxidativo ou osmótico (VALERIO et al., 2011; ZANELLA et al., 2016). Dessa forma, esses açúcares podem auxiliar na estabilização de proteínas e estruturas celulares, particularmente quando o estresse torna - se severo ou persistente (HOEKSTRA et al., 2001) bem como na eliminação de radicais livres, protegendo as células contra o excesso de EROs (THALMANN et al., 2016). Essas

afirmações corroboram os resultados obtidos, especialmente no que diz respeito às rápidas variações observadas.

Além disso, o MeJa possui forte indução no conteúdo de amido, apresentando respostas positivas em variadas espécies como *Arabidopsis*, tabaco, espinafre, alface, pepino e trigo, corroborando os dados obtidos no presente estudo. Essas respostas estão relacionadas ao aumento de genes envolvidos na biossíntese do carboidrato em questão e, possivelmente, na supressão daqueles ligados à degradação do mesmo (TAKAHASHI; HARA, 2014).

O AS é um composto fenólico capaz de aumentar o crescimento e o rendimento de algumas espécies por constituir importante regulador da fotossíntese, aumentando a atividade de enzimas-chave na síntese de carboidratos, ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) e anidrase carbônica (RIVAS; PLASENCIA, 2011). Esse efeito pode explicar o acúmulo de esqueletos carbônicos observados no presente trabalho.

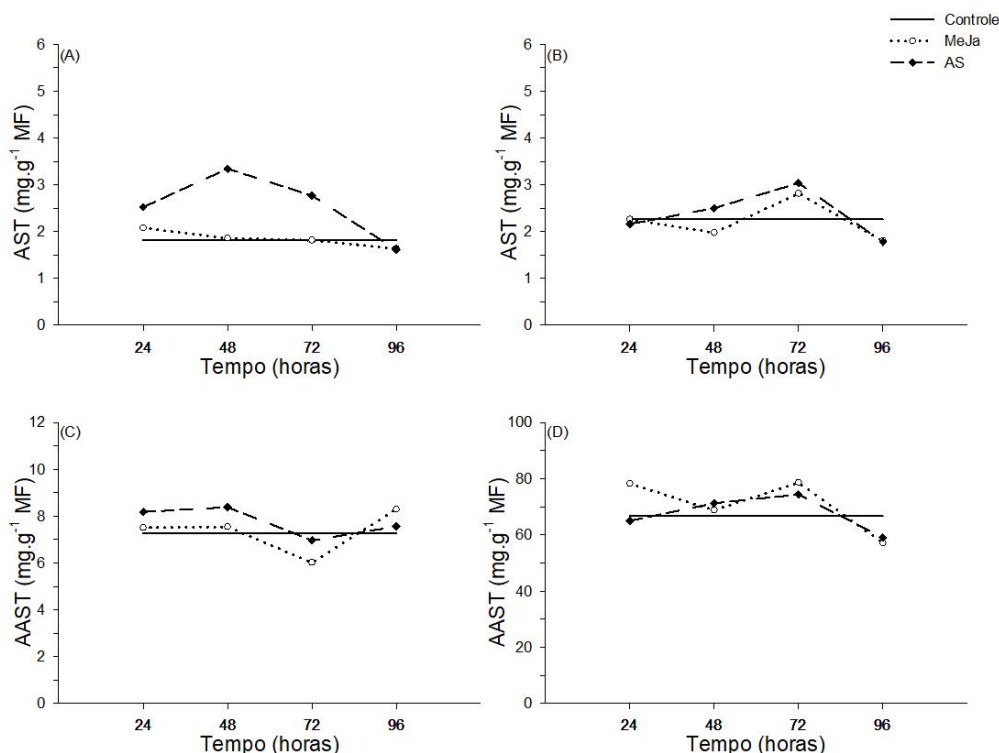


Figura 6. Teores de açúcares solúveis totais (A e B) e aminoácidos solúveis totais (C e D) presentes em tecidos foliares e radiculares de plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, após 24, 48, 72 e 96 horas do cultivo em sistema hidropônico na presença de metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS). Médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro e padronizadas pela média dos controles em cada tempo e ajustadas pela média geral, conforme equação $Y_{ijk} = Y_{ijk} - u_{ci} + u$.

O açúcar desempenha papel central nas vias biossintéticas de metabólitos primários e secundários, como blocos de construção de macromoléculas, no controle de processos de desenvolvimento (PRICE et al., 2004) e no mecanismo de defesa das plantas (GUPTA; KAUR, 2005), existindo grande quantidade de genes que induzem a produção desses açúcares, que, por sua vez, atuam como rede regulatória complexa ou de transdução de sinal relacionadas aos estresses ambientais (GIBSON, 2000; PRICE et al., 2004).

Para o AST, nos tecidos foliares, o MeJa demonstrou estabilidade na concentração, ficando muito próximo ao controle. A aplicação de doses de ácido jasmônico eleva a exportação de carbono das folhas para o caule e raízes (HENKES et al., 2007), o que pode explicar a maior concentração de AST nos tecidos radiculares. De forma geral, as respostas verificadas nas raízes foram muito instáveis e dinâmicas. É imprescindível ressaltar que as mudanças no teor

de açúcares não seguem padrão, podendo variar de acordo com os genótipos e os fatores estressantes (MORSY et al., 2007). Assim, tal afirmação pode justificar o comportamento distinto entre os elicitores utilizados no presente estudo.

Nas folhas das plantas tratadas com AS, ocorreu o efeito mais pronunciado sobre o AST. O elicitor incrementou os teores até as 48 horas e, mesmo com declínio após este período, as médias obtidas foram superiores aos outros tratamentos. Nos tecidos radiculares, o acréscimo nos teores ocorreu até as 72 horas. Estudos proteômicos revelaram que a aplicação exógena de AS pode regular positivamente ou negativamente algumas proteínas e enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (RAJJOU et al., 2006; CHAN et al., 2007; CHAN et al., 2008; TARCHEVSKY et al., 2010). Todos estes efeitos indicam que o SA pode ter efeito dramático no metabolismo de açúcares nas plantas. Amin et al. (2007) descobriram que o AS regula o conteúdo de açúcar (translocação da fonte para o dreno), causando aumento significativo nos açúcares solúveis totais. Dessa forma, é possível inferir que o declínio obtido a partir das 48 horas nos órgãos superiores, foi em decorrência de transporte a outros órgãos.

As reduções observadas podem também estar relacionadas ao aumento na concentração de aminoácidos livres nas folhas, indicando a intensa atividade metabólica em função do maior consumo energético para a assimilação do nitrogênio (SOUZA et al., 1999). Essa consideração é validada especialmente para os tecidos radiculares onde ambos elicitores demonstraram comportamentos análogos para as tendências de AST e AAST.

Cabe ressaltar que efeitos diferenciais da relação fonte-dreno no metabolismo das plantas são induzidos por fatores ambientais desfavoráveis, levando a uma expressão diferencial de várias proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, tais como enzimas relacionadas à biossíntese de amido (ADP - glicose pirofosforilase) e metabolismo de sacarose (sacarose sintase, sacarose fosfato sintase e invertases) (ROSA et al., 2009).

A elevação nos teores de sacarose obtida para o AS pode estar relacionada ao aumento na eficiência de carboxilação, sobre a qual elicitor possui influência. Esses dados também podem ser corroborados pelo

incremento no teor de clorofilas nos momentos iniciais de avaliação. A queda observada possivelmente está ligada ao aumento na atividade de invertases.

Em relação ao teor de AAST (Figura 6C), nos tecidos foliares, os elicitores promoveram efeitos muito semelhantes. Nas primeiras 48 horas, ambos apresentaram pequeno incremento em relação ao controle, com ênfase para o AS. No período seguinte, ocorreram quedas nas médias, sendo elas inferiores às observadas nas plantas isentas de aplicação. O período final foi marcado por nova elevação no teor de AAST.

Nos tecidos radiculares, para o MeJa (Figura 6D), a tendência observada foi mais dinâmica, com picos as 24 e 72 horas intercalados com declínios as 48 e 96 horas. Já o AS apresentou elevação constante, decaindo somente no último período de análise.

A literatura traz resultados variados sobre os efeitos do MeJA na concentração de AAST. Em plantas de repolho, redução nestes compostos foram obtidos. Em contrapartida, as respostas foram positivas em plantas de tabaco (HANIK et al., 2010). Todos estes resultados evidenciam que as respostas mediadas por MeJA sobre este parâmetro são dependentes da espécie bem como da dose utilizada. Além disso, o fitohormônio pode atuar não apenas como elicitor mas como regulador negativo do metabolismo primário das plantas. Portanto, a concentração de elicitores deve ser cuidadosamente considerada, a fim de evitar efeitos prejudiciais (HUNG et al., 2005; CHEESEMAN, 2007).

A via do ácido chiquimico é capaz de converter simples precursores de carboidratos derivados da glicólise e via das pentoses fosfato em aminoácidos aromáticos (BRYANT et al., 1983). Nos tecidos radiculares, para AST e AAST, ambos elicitores exibiram comportamentos muito semelhantes, indicando esta possível alocação de recursos. Além disso, é possível inferir que as respostas de biossíntese de aminoácidos foram também afetadas pelos teores de nitrato disponíveis para as plantas. Kováčik et al. (2010) relataram aumentos nos teores de aminoácidos, principalmente os derivados do glutamato, em plantas de *Scenedesmus quadricauda* submetidas ao AS. Essas observações podem indicar maior efeito do referido elicitor sobre GOGAT e a nitrato redutase, corroborando as relações supracitadas (FARIDUDDIN; AHMAD, 2003).

Nos tecidos foliares, o teor de aminoácidos solúveis totais apresentou comportamento muito semelhante aos valores verificados para prolina, nos períodos de 48, 72 e 96 horas, indicando o redirecionamento de compostos para síntese do osmólito em resposta à aplicação de MeJa e AS. Nas raízes, não ocorreu a mesma relação, o que sugere a realocação dos aminoácidos em outras moléculas.

4.4 Conclusões

Plantas de *A. cruentus* submetidas à elicitação por MeJa e AS apresentam aumento nos índices de pigmentos fotossintéticos, especialmente as 48 horas após a aplicação.

O AS estimula a síntese de prolina, ao contrário do MeJa, o qual promove o ajuste osmótico possivelmente através da síntese de outros osmólitos.

A presença dos elicitores MeJa e AS altera a homeostase redox de plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria, sendo o H₂O₂ gerado possível indutor de metabólitos secundários.

MeJa e AS são capazes de incrementar o teor de carboidratos, provavelmente pelo aprimoramento dos processos fotossintéticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho realizado permitiu a obtenção de valiosos dados e auxiliou na compreensão de respostas fisiológicas e bioquímicas, tanto relativas ao metabolismo secundário quanto ao primário, de plantas de *A. cruentus*, cv. BRS Alegria submetidas à elicitação com metil jasmonato e ácido salicílico. Os estudos fomentaram ainda o desenvolvimento de protocolos de estabelecimento e multiplicação in vitro, os quais permitirão a manutenção de um banco de plantas da referida espécie no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Pelotas, facilitando assim a realização de ensaios posteriores.

Os resultados observados indicam estratégias de cultivo de *Amaranthus cruentus* os quais podem otimizar a produção de moléculas de interesse, especialmente de pigmentos betalâmicos e flavonoides. É emergente a necessidade de trabalhos voltados à investigação de métodos de indução de biossíntese de metabólitos secundários, visto que a demanda por este tipo de fitoquímico tem aumentado nos últimos anos. Assim, a grande necessidade de ampliar as pesquisas nessa área, faz-se necessária, sobretudo no sentido de aprofundar respostas relativas à expressão de genes relacionados às rotas envolvidas.

As informações adquiridas fornecerão margem para pesquisas adicionais com estes ou outros elicitores por concentrações variadas, formas de aplicação e cultivo bem como tempos de exposição.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, F.; GOFFART, J. **Potential indicators based on leaf flavonoids content for the evaluation of potato crop nitrogen status**. in: 11th ICPA Indianapolis Mi USA: pp. 1-18 **(Mx)** 2012.
- ADEBOOYE, O.; VIJAYALAKSHMI, R.; SINGH, V. Peroxidase activity, chlorophylls and antioxidant profile of two leaf vegetables (*Solanum nigrum* L. and *Amaranthus cruentus* L.) under six pretreatment methods before cooking. **International journal of food science & technology**, v. 43, n. 1, p. 173-178, 2008.
- ADOLF, V. et al. Varietal differences of quinoa's tolerance to saline conditions. **Plant and Soil**, v. 357, n. 1-2, p. 117-129, 2012.
- AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant science**, v. 196, p. 67-76, 2012.
- AGUILAR, E. et al. Amaranth seed varieties. A chemometric approach. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 7, n. 4, p. 199-206, 2013.
- AGRAWAL, A. Benefits and costs of induced plant defense for *Lepidium virginicum* (Brassicaceae). **Ecology**, v. 81, n. 7, p. 1804-1813, 2000.
- ALAM, M. et al. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. **Nutrition & metabolism**, v. 13, n. 1, p. 27, 2016.
- ALI, M.; HAHN, E.-J.; PAEK, K.-Y. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 607-621, 2007.
- ALI, H.; HOUGHTON, P.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 449-455, 2006.
- ALMODARES, A.; HADI, M.; DOSTI, B. The effects of salt stress on growth parameters and carbohydrates contents in sweet sorghum. **Res. J. Environ. Sci**, v. 2, n. 4, p. 298-304, 2008.
- ALVAREZ-JUBETE, L.; ARENDT, E. K.; GALLAGHER, E. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 2, p. 106-113, 2010.
- ALVAREZ, M. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. In: **Programmed Cell Death in Higher Plants**. Springer, Dordrecht, 2000. p. 185-198.

ÁLVAREZ-ROBLES, M. et al. Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 273-279, 2016.

AMIN A., RASHAD M., EL-ABAGY H. Physiological effect of indole-3-butyric acid and salicylic acid on growth, yield and chemical constituents of onion plants. **J. Appl. Sci. Res.**, v. 3, n. 1554-1563, 2007.

AMINI, S.; GHOBADI, C.; YAMCHI, A. Proline accumulation and osmotic stress: an overview of P5CS gene in plants. **Journal of Plant Molecular Breeding**, v. 3, n. 2, p. 44-55, 2015.

ANGELOVA, Z.; GEORGIEV, S.; ROOS, W. Elicitation of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 20, n. 2, p. 72-83, 2006.

ANJUM, S. et al. Effect of exogenous methyl jasmonate on growth, gas exchange and chlorophyll contents of soybean subjected to drought. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 47, p. 9647-9656, 2011.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Factors affecting Italian consumer attitudes toward functional foods. 2011.

ANURADHA, S.; RAO, S. Seeta Ram. Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 151-153, 2001.

ARIMURA, G.-I. et al. Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 277, n. 2, p. 305-310, 2000.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and experimental botany**, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.

ASMA, M.; LINGAKUMAR, K. Jasmonate foliar spray induced vegetative growth and pigment composition in *Vigna Radiata* L. WILCZEK. **Int J Adv Res**, v. 3, n. 1, p. 664-669, 2015.

ATTIA, A.; DESSOKY, E.; EL-TARRAS, A.. In vitro propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Al-Taif Rose plant. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 48, p. 10888-10893, 2012.

AZEVEDO, R. et al. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-298, 1998.

BABST, B. et al. Jasmonic acid induces rapid changes in carbon transport and partitioning in *Populus*. **New Phytologist**, v. 167, n. 1, p. 63-72, 2005.

BAENAS, N.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MORENO, D. Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13541-13563, 2014.

BAGAL, U. et al. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. In: **BMC genomics**. BioMed Central, 2012. p. S1.

BAJGUZ, A. Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 209-215, 2000.

BALLARE, C. Illuminated behaviour: phytochrome as a key regulator of light foraging and plant anti-herbivore defence. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 6, p. 713-725, 2009.

BANDINELLI, M. et al. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação in vitro e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 242-247, 2013.

BATES, L. et al. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil, The Hague**, v.39, p.205-207, 1973.

BENDALY, A. et al. Physiological and leaf metabolome changes in the xerohalophyte species *Atriplex halimus* induced by salinity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, p. 208-218, 2016.

BERGANZA, B. et al. Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 1-6, 2003.

BERGER, S.; SINHA, A.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 15-16, p. 4019-4026, 2007.

BETTAIEB, I. et al. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1103-1111, 2011.

BHUIYAN, M.; ADACHI, T. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. **Journal of plant physiology**, v. 160, n. 9, p. 1117-1124, 2003.

BI, H. et al. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. **Journal of chemical ecology**, v. 33, n. 5, p. 1089-1103, 2007.

BIASI, L. et al. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 10, p. 1587-1594, 1998.

BOLTON, M. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. **Molecular plant-microbe Interactions**, v. 22, n. 5, p. 487-497, 2009.

BORGES, W. L. et al. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio de acessos de amendoim com estirpes nativas de rizóbios. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 1, p. 32-37, 2007.

BORODUSKE, A. et al. In vitro culture type and elicitation affects secoiridoid and xanthone LC–ESI–TOF MS profile and production in *Centaureum erythraea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 126, n. 3, p. 567-571, 2016.

BORSANI, O.; VALPUESTA, V.; BOTELLA, M. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. **Plant physiology**, v. 126, n. 3, p. 1024-1030, 2001.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRADY, K. et al. Effects of processing on the nutraceutical profile of quinoa. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1209-1216, 2007.

BRECHNER, M.; ALBRIGHT, L.; WESTON, L. Impact of a variable light intensity at a constant light integral: effects on biomass and production of secondary metabolites by *Hypericum perforatum*. In: **International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants 756**. 2007. p. 221-228.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

BROECKLING, C. et al. Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 410, p. 323-336, 2004.

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

BRYANT, J.; CHAPIN, F.; KLEIN, D. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. **Oikos**, p. 357-368, 1983.

BUFFA FILHO, W. et al. Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus ilicifolia*. **Eclética Química**, v. 27, n. 1es, 2002.

CAI, J. et al. Elicitation of furanocoumarins in *Changium myrsinioides* suspension cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 130, n. 1, p. 1-12, 2017.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2288-2294, 2003.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 370-376, 2005.

CAKMAK, I; HORST, W. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxido dismutase, catalase, and peroxidases activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, n.3, p. 463-468, 1991.

CAMARGOS, L. S. de. **Análise das alterações no metabolismo de nitrogênio em *Canavalia ensiformes* (L) em resposta a variações na concentração de nitrato**. Dissertação (Mestrado em Ciências- Área de concentração em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luis de Quieroz, São Paulo, 2002. 113f.

CAO, S. et al. MeJA induces chilling tolerance in loquat fruit by regulating proline and γ -aminobutyric acid contents. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1466-1470, 2012.

CAO, S. et al. The effects of host defence elicitors on betacyanin accumulation in *Amaranthus mangostanus* seedlings. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1715-1718, 2012.

CAPRILES, V. et al. Effects of processing methods on amaranth starch digestibility and predicted glycemic index. **Journal of food science**, v. 73, n. 7, p. H160-H164, 2008.

CARETTO, S. et al. Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26378-26394, 2015.

CASELATO-SOUSA, V.; AMAYA-FARFÁN, J. State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 4, p. R93-R104, 2012.

CASTRO, K. et al. Multiplicação in vitro de *Limonium brasiliensis* (BOISS.) Kuntze: diferentes concentrações de BAP e sais minerais no meio de cultura. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS**. Lavras: UFLA, 2003. p. 132.

CATALDO, D. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-81, 1975.

CAYLEY, S.; RECORD J., M. T. Large changes in cytoplasmic biopolymer concentration with osmolality indicate that macromolecular crowding may regulate protein–DNA interactions and growth rate in osmotically stressed

Escherichia coli K-12. **Journal of Molecular Recognition**, v. 17, n. 5, p. 488-496, 2004.

CHAN, Z. et al. Proteome approach to characterize proteins induced by antagonist yeast and salicylic acid in peach fruit. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 5, p. 1677-1688, 2007.

CHAN, Z. et al. Functions of defense-related proteins and dehydrogenases in resistance response induced by salicylic acid in sweet cherry fruits at different maturity stages. **Proteomics**, v. 8, n. 22, p. 4791-4807, 2008.

CHANOCA, A. et al. Anthocyanin vacuolar inclusions form by a microautophagy mechanism. **The plant cell**, v. 27, n. 9, p. 2545-2559, 2015.

CHEE, F. et al. Effects of methyl-jasmonate on 9-methoxycanthin-6-one content in *Eurycoma longifolia* (tongkat ali) root culture. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 3, p. 897-904, 2015.

CHEESEMAN, J. Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. **Plant stress**, v. 1, n. 1, p. 4-15, 2007.

CHEN, H.; JONES, A.; HOWE, G. Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. **FEBS letters**, v. 580, n. 11, p. 2540-2546, 2006.

CHEN, T.; MURATA, N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. **Plant, cell & environment**, v. 34, n. 1, p. 1-20, 2011.

CHEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, v. 262, n. 5141, p. 1883-1886, 1993.

CHENG, W. et al. Study of salicylic acid influence on seedling growth and nitrogen metabolism in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). **Journal of Food Engineering and Technology**, v. 7, n. 2, p. 47-47, 2018.

CHEONG, J.-J.; CHOI, Y. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. **TRENDS in Genetics**, v. 19, n. 7, p. 409-413, 2003.

CHENG, W. et al. Study of salicylic acid influence on seedling growth and nitrogen metabolism in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). **Journal of Food Engineering and Technology**, v. 7, n. 2, p. 47-47, 2018.

CHIVENG, P. et al. The potential role of neglected and underutilised crop species as future crops under water scarce conditions in Sub-Saharan Africa. **International journal of environmental research and public health**, v. 12, n. 6, p. 5685-5711, 2015.

CHOI, J.-A. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. **International journal of oncology**, v. 19, n. 4, p. 837-844, 2001.

CHOMEL, M. et al. Plant secondary metabolites: a key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. **Journal of Ecology**, v. 104, n. 6, p. 1527-1541, 2016.

CHONG, T. et al. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3397-3405, 2005.

CIPOLLINI, D. Stretching the limits of plasticity: can a plant defend against both competitors and herbivores?. **Ecology**, v. 85, n. 1, p. 28-37, 2004.

CONCEIÇÃO, L. et al. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. **Phytochemistry**, v. 67, n. 2, p. 149-155, 2006.

COOPER, R. Re-discovering ancient wheat varieties as functional foods. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 5, n. 3, p. 138-143, 2015.

COSTA, K. et al. Doses e fontes de nitrogênio em pastagem de capim-marandu: I-alterações nas características químicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 4, p. 1591-1599, 2008.

CREELMAN, R.; Mulpuri, R. The oxylipin pathway in Arabidopsis. **The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists**, v. 1, 2002.

CROTEAU, R. et al. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.

DANAEE, M. et al. Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 265-272, 2015.

DE LA ROSA, A.; SILVA-SÁNCHEZ, C.; DEMEJIA, E. Amaranth: an ancient crop for modern technology. In: **Hispanic Foods Chemistry and Flavor**. 2007. p. 103-116.

DEMPSEY, D.'M.; KLESSIG, D. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans?. **BMC biology**, v. 15, n. 1, p. 23, 2017.

DESIKAN, R. et al. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspension cultures. **Biochemical Journal**, v. 330, n. 1, p. 115-120, 1998.

DEY, A. et al. Elevated antioxidant potential of chlorocholine chloride-treated in vitro grown *Stevia rebaudiana* Bertonii. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, n. 6, p. 1775-1783, 2013.

DIAS, D.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DIEM, K.; SCHEIBE, R. 2004. Redox regulation: an introduction. **Physiol Plant** 120:1-3.

DIHAZI, A. et al. Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 42, n. 1, p. 9-16, 2003.

DJILIANOV, D. et al. In vitro culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 80, n. 1, p. 115-118, 2005.

DIXON, R. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843, 2001.

DIXON, R. et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, v.3, n.5, p.371-390, 2002.

DIXON, R.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 1085, 1995.

DONG, J.; WAN, G.; LIANG, Z. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. **Journal of biotechnology**, v. 148, n. 2-3, p. 99-104, 2010.

DOREY, S. et al. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 5, p. 646-655, 1997.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International journal of food science & technology**, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2000.

DRINKWATER, J. et al. Effects of cooking on rutin and glutathione concentrations and antioxidant activity of green asparagus (*Asparagus officinalis*) spears. **Journal of functional foods**, v. 12, p. 342-353, 2015.

DUDONNÉ, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1768-1774, 2009.

DZAZIO, P. et al. Micropropagation of '420-A' grapevine rootstock. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 759-764, 2002.

EARLY, D. Cultivation and uses of amaranth in contemporary Mexico. In: **Proceedings of the first Amaranth Seminar**. Rodale Press, 1977. p. 39-60.

ERIG, A. et al. Enraizamento in vitro e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. MC e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1-2, 2004.

ESPINEL, G. et al. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Amaranthus cruentus* L., cv. BRS Alegria. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-congrega urcamp-2017**, p. 1632-1648, 2017.

EDER, J.; COSIO, E. Elicitors of plant defense responses. In: **International review of cytology**. Academic Press, 1994. p. 1-36.

EL-SHERBENY, M.; DA SILVA, J. Foliar treatment with proline and tyrosine affect the growth and yield of beetroot and some pigments in beetroot leaves. **Journal of Horticultural Research**, v. 21, n. 2, p. 95-99, 2013.

EL-SHORA, H. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. **Plant Science**, v. 162, n. 1, p. 1-7, 2002.

EL-TAYEB, M. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. **Plant Growth Regulation**, v. 45, n. 3, p. 215-224, 2005.

EL-TAYEB, M.; EL-ENANY, A.; AHMED, N. Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Growth Regulation**, v. 50, n. 2-3, p. 191-199, 2006.

EL-ZAEDDI, H. et al. Preharvest treatments with malic, oxalic, and acetylsalicylic acids affect the phenolic composition and antioxidant capacity of coriander, dill and parsley. **Food chemistry**, v. 226, p. 179-186, 2017.

ELWAN, M.; EL-HAMAHMY, M. Improved productivity and quality associated with salicylic acid application in greenhouse pepper. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 521-526, 2009.

ERB, M.; MELDAU, S.; HOWE, G. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. **Trends in plant science**, v. 17, n. 5, p. 250-259, 2012.

ESCHRICH, W. Free Space Invertase, its Possible Role in Phloem Unloading 1. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 93, n. 1, p. 363-378, 1980.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 10 Fev. 2019.

FARIDUDDIN, Q.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. **Photosynthetica**, v. 41, n. 2, p. 281-284, 2003.

FARNSWORTH, N. R. Screening for new medicines. **Biodiversity**, p. 83-97, 1988.

FARZINEBRAHIMI, R. et al. The effect of various media and hormones via suspension culture on secondary metabolic activities of (*Cape Jasmine*) *Gardenia jasminoides* ellis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

FERNANDEZ, C. et al. Potential allelopathic effect of *Pinus halepensis* in the secondary succession: an experimental approach. **Chemoecology**, v. 16, n. 2, p. 97-105, 2006.

FERNANDEZ, C. et al. Allelochemicals of *Pinus halepensis* as drivers of biodiversity in Mediterranean open mosaic habitats during the colonization stage of secondary succession. **Journal of chemical ecology**, v. 39, n. 2, p. 298-311, 2013.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. et al. Betaxanthin-rich extract from cactus pear fruits as yellow water-soluble colorant with potential application in foods. **Plant foods for human nutrition**, v. 73, n. 2, p. 146-153, 2018.

FERRARI, S. Biological elicitors of plant secondary metabolites: Mode of action and use in the production of nutraceuticals. In: **Bio-Farms for Nutraceuticals**. Springer, Boston, MA, 2010. p. 152-166.

FERRER, J.-L. et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 356-370, 2008.

FIEHN, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. In: **Functional genomics**. Springer, Dordrecht, 2002. p. 155-171.

FLORES, G.; DEL CASTILLO, M. Influence of preharvest and postharvest methyl jasmonate treatments on flavonoid content and metabolomic enzymes in red raspberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 97, p. 77-82, 2014.

FRUTOS, M.; RINCÓN-FRUTOS, L.; VALERO-CASES, E. Rutin. In: **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. Academic Press, 2019. p. 111-117.

GAI, Q.-Y. et al. Elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures by salicylic acid and methyl jasmonate for the enhanced production of pharmacologically active alkaloids and flavonoids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 137, n. 1, p. 77-86, 2019.

GALLAGHER, E.; GORMLEY, T.; ARENDT, E. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 3-4, p. 143-152, 2004.

GANDÍA-HERRERO, F.; ESCRIBANO, J.; GARCÍA-CARMONA, F. Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. **Plant physiology**, v. 138, n. 1, p. 421-432, 2005.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. **Trends in plant science**, v. 18, n. 6, p. 334-343, 2013.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; ESCRIBANO, J. A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of betaxanthins. **Journal of Chromatography A**, v. 1078, n. 1-2, p. 83-89, 2005.

GAO, X.-P. et al. Jasmonic acid is involved in the water-stress-induced betaine accumulation in pear leaves. **Plant, Cell & Environment**, v. 27, n. 4, p. 497-507, 2004.

GAUTIER, H. et al. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance?. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1241-1250, 2008.

GAWLIK-DZIKI, U. et al. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts—in vitro study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 154-160, 2013.

GEORGIEV, V. et al. Betalain production in plant in vitro systems. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 5, p. 581-593, 2008.

GEORGIEV, M.; WEBER, J.; MACIUK, A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 809-823, 2009.

GHARIB, F. Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. **Int. J. Agr. Biol**, v. 4, p. 485-492, 2006.

GHASEMZADEH, A. et al. Combined effect of CO₂ enrichment and foliar application of salicylic acid on the production and antioxidant activities of anthocyanin, flavonoids and isoflavonoids from ginger. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 229, 2012.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Effect of salicylic acid application on biochemical changes in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 5, p. 790-795, 2012.

GIANNOPOLITIS, C.; RIES, S. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

GIBSON, S. Plant sugar-response pathways: part of a complex regulatory web. **Plant Physiology**, v.124, n.4, p.1532–1539, 2000.

GILL, S.; NARENDRA, T. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 909-930, 2010.

GINÉ-BORDONABA, J.; TERRY, L. Effect of deficit irrigation and methyl jasmonate application on the composition of strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit and leaves. **Scientia horticulturae**, v. 199, p. 63-70, 2016.

GIRI, 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 (PCTOC)**, v. 126, n. 1, p. 1-18, 2016.

GLASS, A. Influence of Phenolic Acids upon Ion Uptake: III. INHIBITION OF POTASSIUM ABSORPTION. **Journal of Experimental Botany**, v. 25, n. 6, p. 1104-1113, 1974.

GÓMEZ, S. et al. Methyl jasmonate elicits rapid changes in carbon and nitrogen dynamics in tomato. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 835-844, 2010.

GONDOR, O. et al. Salicylic acid induction of flavonoid biosynthesis pathways in wheat varies by treatment. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1447, 2016.

GORINSTEIN, S. et al. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 3-4, p. 321-328, 2007.

GOUDA, Sushanto et al. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1538, 2016.

GUARDIANELLI, L.; SALINAS, M.; PUPPO, M. Chemical and thermal properties of flours from germinated amaranth seeds. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, n. 2, p. 1078-1088, 2019.

GUPTA, A.; KAUR, N. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. **Journal of biosciences**, v. 30, n. 5, p. 761-776, 2005.

GRAEBNER, I. et al. Carotenoids from native Brazilian dark-green vegetables are bioavailable: a study in rats. **Nutrition research**, v. 24, n. 8, p. 671-679, 2004.

GRAHAM, D.; SMYDZUK, J. Use of anthrone in the quantitative determination of hexose phosphates. **Analytical biochemistry**, v.11, p.246-255, 1965.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1. ed. Brasília: SPI/Embrapa - CNPH, 1998. p. 183-230. v. 1.

GRIEVE, C.; GRATTAN, S. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and soil**, v. 70, n. 2, p. 303-307, 1983.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de Biotecnologia**. Edição da Steinmacher, 2006.

GUO, R. et al. Jasmonic acid and glucose synergistically modulate the accumulation of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 18, p. 5707-5719, 2013.

HANDEL, V. Direct microdetermination sucrose. **Analytical Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 280-283, 1968.

HANIK, N. et al. Partitioning of new carbon as ^{11}C in *Nicotiana tabacum* reveals insight into methyl jasmonate induced changes in metabolism. **Journal of chemical ecology**, v. 36, n. 10, p. 1058-1067, 2010.

HAO, J. et al. Insights into salicylic acid responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons based on a comparative proteomic analysis. **Plant Science**, v. 187, p. 69-82, 2012.

HAYAT, Q. et al. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. **Environmental and experimental botany**, v. 68, n. 1, p. 14-25, 2010.

HAYAT, S. et al. Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. **Acta Agronomica Hungarica**, v. 53, n. 4, p. 433-437, 2005.

HAYDEN, Anita L. Aeroponic and hydroponic systems for medicinal herb, rhizome, and root crops. **HortScience**, v. 41, n. 3, p. 536-538, 2006.

HASEGAWA, P. et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual review of plant biology**, v. 51, n. 1, p. 463-499, 2000.

HASHMI, N. et al. Exogenous salicylic acid stimulates physiological and biochemical changes to improve growth, yield and active constituents of fennel essential oil. **Plant Growth Regulation**, v. 68, n. 2, p. 281-291, 2012.

HASSINI, I. et al. Improvement of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* L. var. italica) growth and quality by KCl seed priming and methyl jasmonate under salinity stress. **Scientia horticulturae**, v. 226, p. 141-151, 2017.

HAUGHTON, C. **Green immigrants: the plants that transformed America**. 1978.

HENKES, G. et al. Jasmonic acid treatment to part of the root system is consistent with simulated leaf herbivory, diverting recently assimilated carbon towards

untreated roots within an hour. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, n. 9, p. 1229-1236, 2008.

HERMS, D.; MATTSON, W. The dilemma of plants: to grow or defend. **The quarterly review of biology**, v. 67, n. 3, p. 283-335, 1992.

HILOU, A.; MILLOGO-RASOLODIMBY, J.; NACOULMA, O. Betacyanins are the most relevant antioxidant molecules of *Amaranthus spinosus* and *Boerhavia erecta*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 11, p. 645-652, 2013.

HOEKSTRA, F.; GOLOVINA, E.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, n.9, p.431–438, 2001.

HOAGLAND D.R.; ARNON, D. I. **The waterculture method for growing plants without soil**. Berkeley: Agric. Exp. Stn., Univ. of California, 1950.

HUANG, C. et al. Effects of exogenous salicylic acid on the physiological characteristics of *Dendrobium officinale* under chilling stress. **Plant growth regulation**, v. 79, n. 2, p. 199-208, 2016.

HUANG, J. et al. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. **Plant Physiology**, v.153, n.4, p.1526-1538, 2010.

HUERTA-OCAMPO, J.; DE LA ROSA, A. Amaranth: a pseudo-cereal with nutraceutical properties. **Current Nutrition & Food Science**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2011.

HUGHES, N.; CARPENTER, K.; CANNON, J. Estimating contribution of anthocyanin pigments to osmotic adjustment during winter leaf reddening. **Journal of plant physiology**, v. 170, n. 2, p. 230-233, 2013.

HUNG, S.H.; YU, C.-Y.; LIN, C. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, 2005.

IQBAL, N. et al. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 34-42, 2014.

ISUTSA, D. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 99, n. 3, p. 395-400, 2004.

ITHAL, N.; REDDY, A. Rice flavonoid pathway genes, *OsDfr* and *OsAns*, are induced by dehydration, high salt and ABA, and contain stress responsive promoter elements that interact with the transcription activator, OsC1-MYB. **Plant Science**, v. 166, n. 6, p. 1505-1513, 2004.

IZAGUIRRE, M. et al. Remote sensing of future competitors: impacts on plant defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 18, p. 7170-7174, 2006.

JAGENDORF, A.; TAKABE, T. Inducers of glycinebetaine synthesis in barley. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1827-1835, 2001.

JALEEL, C. Changes in non enzymatic antioxidants and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* with different soil salinity regimes. **molecules**, v. 2, p. 2, 2009.

JANAS, K. et al. The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings. **Journal of plant physiology**, v. 167, n. 4, p. 270-276, 2010.

JANDA, T. et al. Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. **Phytochemistry**, v. 68, n. 12, p. 1674-1682, 2007.

JANDA, T. et al. Role of salicylic acid in the induction of abiotic stress tolerance. In: **Salicylic acid: A plant hormone**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 91-150.

JIN, H. et al. Inductive effect of methyl jasmonate on amaranthin accumulation in *Amaranthus mangostanus* L. seedlings. **Journal of Biology**, n. 2, p. 12, 2016.

JONES, J.; DANGL, J. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323, 2006.

JUNG, S. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 225-231, 2004.

KALINOVA, J.; DADAKOVA, E. Rutin and total quercetin content in amaranth (*Amaranthus* spp.). **Plant foods for human nutrition**, v. 64, n. 1, p. 68, 2009.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5178-5185, 2001.

KARBAN, R.; YANG, L.; EDWARDS, K. F. Volatile communication between plants that affects herbivory: a meta-analysis. **Ecology letters**, v. 17, n. 1, p. 44-52, 2014.

KATALINIC, V. et al. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food chemistry**, v. 94, n. 4, p. 550-557, 2006.

KAUR, G. et al. Versatile roles of plant NADPH oxidases and emerging concepts. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 3, p. 551-563, 2014.

KAWANO, T.; MUTO, S. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 685-693, 2000.

KEINÄNEN, Markku; OLDHAM, Neil J.; BALDWIN, Ian T. Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3553-3558, 2001.

Kelly GS (2011) Quercetin. *Altern Med Rev* 16:172–194

KENNEDY, D.; WIGHTMAN, E. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 32-50, 2011.

KENRICK, P.; CRANE, P. The origin and early evolution of plants on land. **Nature**, v.389, n.6646, p.33-39, 1997.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas in vitro. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

KHAN, M.; ASGHER, M.; KHAN, N. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 67-74, 2014.

KHAN, M.; GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. **Phytochemistry**, v. 117, p. 267-295, 2015.

KHANDAKER, L.; AKOND, A.; OBA, S. Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaf's bioactive compounds in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.). **Vegetable crops research bulletin**, v. 74, p. 77-86, 2011.

KHRIPACH, V.; ZHABINSKII, V.; KHRIPACH, N. New practical aspects of brassinosteroids and results of their ten-year agricultural use in Russia and Belarus. In: **Brassinosteroids**. Springer, Dordrecht, 2003. p. 189-230.

KIM, D.-O.; JEONG, S.; LEE, C. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food chemistry**, v. 81, n. 3, p. 321-326, 2003.

KIM, K. et al. Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization. **Bioresource technology**, v. 96, n. 15, p. 1709-1712, 2005.

KIM, Y. et al. Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum*. **Planta**, v. 233, n. 2, p. 343-355, 2011.

KINGHORN, A. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of natural products**, v. 74, n. 6, p. 1539-1555, 2011.

KLEIN, F. et al. UV-B radiation as an elicitor of secondary metabolite production in plants of the genus *Alternanthera*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, n. 4, p. 615-623, 2018.

KLEINOWSKI, A. et al. Pigment production and growth of *Alternanthera* plants cultured in vitro in the presence of tyrosine. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 2, p. 253-260, 2014.

KLESSIG, D.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant molecular biology**, v. 26, n. 5, p. 1439-1458, 1994.

KLEWICKA, E. et al. Protective effect of lactofermented red beetroot juice against aberrant crypt foci formation, genotoxicity of fecal water and oxidative stress induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine in rats model. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 895-904, 2012.

KLIEBENSTEIN, D.; OSBOURN, A. Making new molecules—evolution of pathways for novel metabolites in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 15, n. 4, p. 415-423, 2012.

KODA, T.; KURODA, Y.; IMAI, H. Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats. **Nutrition Research**, v. 28, n. 9, p. 629-634, 2008.

KOVAČ, M.; RAVNIKAR, M. The effect of jasmonic acid on the photosynthetic pigments of potato plants grown in vitro. **Plant Science**, v. 103, n. 1, p. 11-17, 1994.

KOVÁČIK, J. et al. Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). **Plant Science**, v. 178, n. 3, p. 307-311, 2010.

KOZAI, T. et al. Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, n. 1, p. 49, 1997.

KOZAI, T. et al. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation systems for large-scale commercialization. **Propagation of ornamental plants**, v. 5, n. 1, p. 23-34, 2005.

KRAUS, A. Development of functional food with the participation of the consumer. Motivators for consumption of functional products. **International Journal of Consumer Studies**, v. 39, n. 1, p. 2-11, 2015.

KRYCH, J.; GEBICKA, L. Catalase is inhibited by flavonoids. **International journal of biological macromolecules**, v. 58, p. 148-153, 2013.

KUMAR, D. Salicylic acid signaling in disease resistance. **Plant Science**, v. 228, p. 127-134, 2014.

KUMAR, J.; SINHA, A. Resurgence of natural colourants: a holistic view. **Natural product research**, v. 18, n. 1, p. 59-84, 2004.

KUMAR, R. et al. An inside review of *Amaranthus spinosus* Linn: a potential medicinal plant of India. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 643-653, 2014.

KUNKEL, B. N.; BROOKS, D. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 4, p. 325-331, 2002.

KUZEL, S. et al. Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7907-7911, 2009.

LAMBERT, E.; FAIZAL, A.; GEELLEN, D. Modulation of triterpene saponin production: in vitro cultures, elicitation, and metabolic engineering. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 164, n. 2, p. 220-237, 2011.

LAMOTHE, L. et al. Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) and amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) provide dietary fibres high in pectic substances and xyloglucans. **Food chemistry**, v. 167, p. 490-496, 2015.

LEE, S.; LEE, J. Beneficial bacteria and fungi in hydroponic systems: types and characteristics of hydroponic food production methods. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 206-215, 2015.

LEHMANN, J. Amaranth: Commercialization and industrialization. In: **Amaranth biology, chemistry, and technology**. CRC Press, 2018. p. 207-217.

LEITE, G. et al. Reguladores vegetais e atividade de invertases em cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 718-725, 2009.

LEONE, M. et al. To grow or defend? Low red: far-red ratios reduce jasmonate sensitivity in Arabidopsis seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ 10 stability. **New Phytologist**, v. 204, n. 2, p. 355-367, 2014.

LI, H. et al. Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three *Amaranthus* species. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 75-81, 2015.

LILA, M. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. **BioMed Research International**, v. 2004, n. 5, p. 306-313, 2004.

LIU, F.; STÜTZEL, H. Leaf water relations of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to soil drying. **European Journal of Agronomy**, v. 16, n. 2, p. 137-150, 2002.

LOBELL, D.; SCHLENKER, W.; COSTA-ROBERTS, J. Climate trends and global crop production since 1980. **Science**, v. 333, n. 6042, p. 616-620, 2011.

LÓPEZ-DELGADO, H. et al. Hydrogen peroxide increases potato tuber and stem starch content, stem diameter, and stem lignin content. **American journal of potato research**, v. 82, n. 4, p. 279-285, 2005.

LÓPEZ-ORENES, A. et al. Changes in phenolic metabolism in salicylic acid-treated shoots of *Cistus heterophyllus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 113, n. 3, p. 417-427, 2013.

LUCHO, S. et al. Plant growth regulators as potential elicitors to increase the contents of phenolic compounds and antioxidant capacity in stevia plants. **Sugar Tech**, v. 21, n. 4, p. 696-702, 2019.

LUCIANO, Á.-J. et al. Integrating plant nutrients and elicitors for production of secondary metabolites, sustainable crop production and human health: A review. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 19, n. 3, 2017.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. WinStat—Sistema de Análise Estatística para Windows versão 1.0. Universidade Federal de Pelotas. 2007.

MAGGINI, R.; KIFERLE, C.; PARDOSSI, A. Hydroponic production of medicinal plants. **Medicinal Plants: Antioxidant Properties, Traditional Uses and Conservation Strategies**. Nova Science Publishers, Inc., New York, p. 91-116, 2014.

MAKOBO, N. et al. Nutrient content of Amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) under different processing and preservation methods. **World journal of Agricultural sciences**, v. 6, n. 6, p. 639-643, 2010.

MARCIŃSKA, I. et al. Alleviation of osmotic stress effects by exogenous application of salicylic or abscisic acid on wheat seedlings. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 7, p. 13171-13193, 2013.

MARCONE, M. F. et al. Amaranth as a rich dietary source of β -sitosterol and other phytosterols. **Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)**, v. 58, n. 3, p. 207-211, 2003.

MARENCO, R.; LOPES, N. **Fisiologia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2005. 486 p.

MARTIN, C. et al. How can research on plants contribute to promoting human health?. **The Plant Cell**, v. 23, n. 5, p. 1685-1699, 2011.

MARTÍNEZ-BALLESTA, M. et al. Agricultural practices for enhanced human health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 251-260, 2008.

MARTÍNEZ-ESPLÁ, A. et al. Preharvest application of methyl jasmonate as an elicitor improves the yield and phenolic content of artichoke. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 42, p. 9247-9254, 2017.

MASIDUR, M. et al. Augmentation of photosynthesis, crop productivity, enzyme activities and alkaloids production in sadabahar (*Catharanthus roseus* L.) through application of diverse plant growth regulators. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 117-129, 2012.

MCCOUCH, S. et al. Agriculture: feeding the future. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 23, 2013.

MIFLIN, B.; HABASH, D. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 979–987, 2002.

MILECH, C. et al. Production of pigments in *Alternanthera sessilis* calli mediated by plant growth regulators and light. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 381-388, 2017.

MINALE, L.; PIATTELLI, M.; NICOLAUS, R. Pigments of centrospermae—IV: On the biogenesis of indicaxanthin and betanin in *Opuntia ficus-indica* Mill. **Phytochemistry**, v. 4, n. 4, p. 593-597, 1965.

MISRA, N.; MISRA, E. Salicylic acid changes plant growth parameters and proline metabolism in *Rauwolfia serpentina* leaves grown under salinity stress. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 12, n. 12, p. 1601-1609, 2012.

MISRA, N.; SAXENA, P. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. **Plant Science**, v. 177, n. 3, p. 181-189, 2009.

MIURA, K.; TADA, Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 4, 2014.

MOGHADAM, Y. et al. Dopamine production in hairy root cultures of *Portulaca oleracea* (Purslane) using *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 16, n. 2, p. 409-420, 2014.

MOHAMED, H.; LATIF, H. Improvement of drought tolerance of soybean plants by using methyl jasmonate. **Physiology and molecular biology of plants**, v. 23, n. 3, p. 545-556, 2017.

MOHARRAMNEJAD, S. et al. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on in vitro growth, stevioside production, and oxidative defense system in *Stevia rebaudiana*. **Sugar Tech**, p. 1-8, 2019.

MONFORT, L. et al. Effect of BAP on in vitro culture of *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 458-463, 2012.

MONFORT, L. et al. Micropropagação e germinação de sementes in vitro de atoveran. **Revista Ceres**, v. 62, n. 2, p. 215-223, 2015.

MONZÓN, G. et al. Sunflower root growth regulation: the role of jasmonic acid and its relation with auxins. **Plant growth regulation**, v. 66, n. 2, p. 129-136, 2012.

MORA-PALE, M. et al. Metabolic engineering and in vitro biosynthesis of phytochemicals and non-natural analogues. **Plant science**, v. 210, p. 10-24, 2013.

MOREIRA, M. et al. Etiolated in micropropagation of cv. Pérola Pineapple plant. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 5, p. 1002-1006, 2003.

MORENO, D. A. et al. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 261-280, 2008.

MORENO-ESCAMILLA, J. et al. Effect of Different Elicitors and Preharvest Day Application on the Content of Phytochemicals and Antioxidant Activity of Butterhead Lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata) Produced under Hydroponic Conditions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 26, p. 5244-5254, 2017.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, v. 160, n2, p. 355-360, 2001.

MORO, A.; BROETTO, F.; MORO, E. Antioxidative responses, physiological and productive of rice grown under water deficit and silicon fertilization. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 5, p. 3013-3028, 2015.

MORSY, M. et al. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 2, p. 157-167, 2007.

MUNNÉ-BOSCH, S.; PEÑUELAS, J. Photo-and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. **Planta**, v. 217, n. 5, p. 758-766, 2003.

MUÑOZ- CLARES, R.; VELASCO - GARCÍA, R. Genio y figura de la betaína aldehído deshidrogenasa. **Mensaje bioquímico**, v. 28, 2004.

MUÑOZ, N. et al. Potential uses of wild germplasms of grain legumes for crop improvement. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, p. 328, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MUTHAURA, C. N. et al. Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale district of Kenya. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 545-551, 2007.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NAMDEO, A. et al. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacogn Rev**, v. 1, n. 1, p. 69-79, 2007.

NANA, F. et al. Phytochemical composition, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of *Amaranthus cruentus* L. and *Amaranthus hybridus* L. extracts. **Pharmaceuticals**, v. 5, n. 6, p. 613-628, 2012.

NARAYANI, M.; SRIVASTAVA, S. Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. **Phytochemistry reviews**, v. 16, n. 6, p. 1227-1252, 2017.

NASCIMENTO, A. et al. Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays* L.) consumed in the North of Argentina: Proximates, minerals and trace elements. **Food chemistry**, v. 148, p. 420-426, 2014.

NAVARRO, J. et al. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. **Food Chemistry**, v. 96, n. 1, p. 66-73, 2006.

NAZARLI, H.; AHMADI, A.; HADIAN, J. Salicylic acid and methyl jasmonate enhance drought tolerance in chamomile plants. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 3, 2014.

NEILL, S. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1237-1247, 2002.

NEUGART, S. et al. Indigenous leafy vegetables of Eastern Africa—A source of extraordinary secondary plant metabolites. **Food research international**, v. 100, p. 411-422, 2017.

NEUDECK, L. et al. The contribution of edible wild plants to food security, dietary diversity and income of households in Shorobe Village, northern Botswana. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 10, p. 449-462, 2012.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D.; CRAGG, G.; SNADER, K. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural product reports**, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

NGUYEN, T. et al. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 5, p. 647-659, 2004.

NICOLOSO, F.; ERIG, A. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata* in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 1, p. 1499-1506, 2002.

NORASTEHNIA, A.; NOJAVAN-ASGHARI, M. Effect of methyl jasmonate on the enzymatic antioxidant defense system in maize seedling subjected to paraquat. **Asian J Plant Sci**, v. 5, n. 1, p. 17-23, 2006.

NORMILE, D. The new face of traditional Chinese medicine. **Science**, v. 299, n. 5604, p. 188-190, 2003.

OKSMAN-CALDENTY, K.-M.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in plant science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.

ONG, C. et al. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. **Oncology reports**, v. 11, n. 3, p. 727-733, 2004.

ONG, C. et al. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. **Oncology reports**, v. 11, n. 3, p. 727-733, 2004.

ONO, K. et al. Changes in photosynthetic activity and export of carbon by overexpressing a maize sucrose-phosphate synthase gene under elevated CO₂ in transgenic rice. **Plant production science**, v. 6, n. 4, p. 281-286, 2003.

ORMEÑO, E. et al. Effect of intraspecific competition and substrate type on terpene emissions from some Mediterranean plant species. **Journal of chemical ecology**, v. 33, n. 2, p. 277-286, 2007.

OSORIO-ESQUIVEL, O. et al. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2160-2168, 2011.

OZSOY, N. et al. In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. **Food chemistry**, v. 116, n. 4, p. 867-872, 2009.

PAL, M.; KHOSHOO, T. Evolution and Improvement of Cultivated Amaranths: V. Inviability, weakness, and sterility in hybrids. **Journal of Heredity**, v. 63, n. 2, p. 78-82, 1972.

PANCHE, A.; DIWAN, A.; CHANDRA, S. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, v. 5, 2016.

PAN, W. et al. Bioactive compounds from *Vitex leptobotrys*. **Journal of natural products**, v. 77, n. 3, p. 663-667, 2014.

PASCUAL, M. et al. Biosynthesis and metabolic fate of phenylalanine in conifers. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.1030, 2016.

PAŠKO, P. et al. Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC. **Acta Chromatographica**, v. 20, n. 4, p. 661-672, 2008.

PASTORI, G.; FOYER, C. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant physiology**, v. 129, n. 2, p. 460-468, 2002.

PEREIRA, J.S. et al. Enraizamento in vitro do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) em diferentes concentrações do meio MS. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 17-20, 1999.

PÉREZ-TORTOSA, V. et al. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 362-369, 2012.

PEROTTI, J. et al. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada in vitro com diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1874-1880, 2010.

PITTELKOW, F. et al. Evaluation of agronomic performance of amaranthus (*Amaranthus cruentus* cv. BRS Alegria) in times and seed densities. **Journal of Experimental Agriculture International**, p. 1-13, 2019.

PLATE, A.; ARÊAS, J. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. **Food Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 1-6, 2002.

POULEV, A. et al. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 12, p. 2542-2547, 2003.

PRICE, J. et al. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 16, n. 8, p. 2128-2150, 2004.

QUINTON, I. Indigenous spinach. **Go farming for the farmers of tomorrow**, p. 20, 2006.

RABIER, J. et al. Heavy metal and arsenic resistance of the halophyte *Atriplex halimus* L. along a gradient of contamination in a French Mediterranean spray zone. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 7, p. 1993, 2014.

RADMAN, R. et al. Elicitation of plants and microbial cell systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 91-102, 2003.

RADMANN, E. et al. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento in vitro de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 03, p. 624-628, 2002.

RAGHAVENDRA, S. et al. Enhanced production of L-DOPA in cell cultures of *Mucuna pruriens* L. and *Mucuna prurita* H. **Natural product research**, v. 26, n. 9, p. 792-801, 2012.

RAHIMI, M. et al. Effects of heavy metals on the medicinal plant. **International Journal of Agronomy and Plant Production**, v. 3, n. 4, p. 154-158, 2012.

RAJJOU, L. et al. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. **Plant physiology**, v. 141, n. 3, p. 910-923, 2006.

RAM, M. et al. Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 104, n. 2, p. 171-179, 2011.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.

RAMIREZ-ESTRADA, K. et al. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 182, 2016.

RAO, S.; RAVISHANKAR, G. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology advances**, v. 20, n. 2, p. 101-153, 2002.

RAOMAI, S. et al. Plantlet regeneration of *Paris polyphylla* Sm. via thin cell layer culture and enhancement of steroidal saponins in mini-rhizome cultures using elicitors. **Plant growth regulation**, v. 75, n. 1, p. 341-353, 2015.

RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

RASTOGI, A.; SHUKLA, S. Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 2, p. 109-125, 2013.

RAVICHANDRAN, K. et al. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 670-675, 2013.

RÊGO, G.; POSSAMAI, E. Avaliação de teores de clorofila no crescimento de mudas do jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*). **Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2004.

REIS, A. et al. Callus induction and betacyanin quantification by HPLC/MS-MS in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze. **Hoehnea**, v. 44, n. 1, p. 90-95, 2017.

REN, C.-G.; DAI, C.-C. Jasmonic acid is involved in the signaling pathway for fungal endophyte-induced volatile oil accumulation of *Atractylodes lancea* plantlets. **BMC plant biology**, v. 12, n. 1, p. 128, 2012.

RHODES, D.; HANSON, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annual review of plant biology**, v. 44, n. 1, p. 357-384, 1993.

ROBERTS, S. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nature chemical biology**, v. 3, n. 7, p. 387, 2007.

ROCA, W. et al. Effect of various factors on minimal growth in tissue culture storage of cassava germplasm. In: **Proc. sixth symposium of the international society for tropical root crops**. Lima, Peru. 1984. p. 441-446.

RODRIGUES-BRANDÃO, I. et al. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin in production from leaves of *Alternanthera tenella*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 10, p. 1893-1898, 2014.

ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 17, n. 5, p. 418-420, 1987.

ROSA, M. et al. Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 5, p. 388-393, 2009.

SABBIONE, A. et al. Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 204-214, 2016.

SAN VICENTE, M.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 10, p. 3321-3338, 2011.

SAUER, J. Amaranths as dye plants among the Pueblo peoples. **Southwestern Journal of Anthropology**, v. 6, n. 4, p. 412-415, 1950a.

SAUER, J. The grain amaranths: a survey of their history and classification. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 37, n. 4, p. 561-632, 1950b.

SCHWACHTJE, J.; BALDWIN, I. Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism?. **Plant physiology**, v. 146, n. 3, p. 845-851, 2008.

SCHLIEMANN, W. et al. Betalains of *Celosia argentea*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 1, p. 159-165, 2001.

SENARATNA, T. et al. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. **Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 2, p. 157-161, 2000.

SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. et al. Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst (Physiological and Molecular Plant Pathology 64: 3 (125-133). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, p. 75, 2004.

SHAKIROVA, F. et al. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. **Plant science**, v. 164, n. 3, p. 317-322, 2003.

SHAKYA, P. et al. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 1, p. 70-82, 2019.

SHIM, K. 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*. **원예과학기술지**, v. 28, n. 2, p. 288-294, 2010.

SHU-HSIEN, H. U. N. G.; CHIH-WEN, Y. U.; LIN, Chin Ho. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, 2005.

SHUKLA, S. et al. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2338-2343, 2009.

SIKDER, K. et al. The high antioxidative power of quercetin (aglycone flavonoid) and its glycone (rutin) avert high cholesterol diet induced hepatotoxicity and inflammation in Swiss albino mice. **Food & function**, v. 5, n. 6, p. 1294-1303, 2014.

SINDHUJA, A.; SUDHA, M.; RAHIM, A. Effect of incorporation of amaranth flour on the quality of cookies. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 5, p. 597, 2005.

SINGH, A.; DWIVEDI, P. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. **J. Pharmacogn. Phytochem**, v. 7, n. 1, p. 750-757, 2018.

SIRCAR, D.; MITRA, A. Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota* 2: Confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. **Journal of plant physiology**, v. 166, n. 13, p. 1370-1380, 2009.

SIRO, I. et al. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.

SLAMA, I. et al. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. **Annals of Botany**, v. 115, n. 3, p. 433-447, 2015.

SOUZA, S. et al. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars, and crude protein of rice. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 30, n. 5-6, p. 711-724, 1999.

SORIAL, M. et al. Response of sweet basil to jasmonic acid application in relation to different water supplies. **Biosci Res**, v. 7, n. 1, p. 39-47, 2010.

SPEHAR, C. et al. Amaranth BRS Alegria: alternative for diversification of cropping systems. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 38, n. 5, p. 659-663, 2003.

SPEHAR, C. Morphological differences between *Amaranthus cruentus*, cv. BRS Alegria, and the weed species *A. hybridus*, *A. retroflexus*, *A. viridis* and *A. spinosus*. **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 481-485, 2003.

STAMP, N. et al. Effect of competition on plant allometry and defense. **The American midland naturalist**, v. 151, n. 1, p. 50-65, 2004.

STASWICK, P.; TIRYAKI, I. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 16, n. 8, p. 2117-2127, 2004.

STEINGROEWER, J. et al. Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 1, p. 26-38, 2013.

STINTZING, F.; CARLE, R. Betalains—emerging prospects for food scientists. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 10, p. 514-525, 2007.

STINTZING, F.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends in food science & technology**, v. 15, n. 1, p. 19-38, 2004.

STOKES, M. et al. Interplay between sucrose and folate modulates auxin signaling in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 162, n. 3, p. 1552-1565, 2013.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, n. 3, p. 247-269, 2003.

SU, M. et al. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo in vitro de orquídea. **Científica**, v. 40, n. 1, p. 28-34, 2012.

SUN, B. et al. Effects of plant hormones on main health-promoting compounds and antioxidant capacity of *Chinese kale*. **Food research international**, v. 48, n. 2, p. 359-366, 2012.

SUN, Z. et al. Exogenous application of salicylic acid enhanced the rutin accumulation and influenced the expression patterns of rutin biosynthesis related genes in *Fagopyrum tartaricum* Gaertn leaves. **Plant growth regulation**, v. 68, n. 1, p. 9-15, 2012.

SURESH, B. et al. Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2091-2096, 2004.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. Respostas e Adaptações ao Estresse Abiótico. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artimed, 2013. p.763 - 780.

TAIZ, L.; ZEIGER, E, MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 954 p.

TAJIK, S. et al. Induction of phenolic and flavonoid compounds in leaves of saffron (*Crocus sativus* L.) by salicylic acid. **Scientia Horticulturae**, v. 257, p. 108751, 2019.

TAKAHASHI, I.; HARA, M. Enhancement of starch accumulation in plants by exogenously applied methyl jasmonate. **Plant biotechnology reports**, v. 8, n. 2, p. 143-149, 2014.

TAN, J. et al. Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. **Phytochemistry**, v. 65, n. 6, p. 691-699, 2004.

TANG, Y.; TSAO, R. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 7, p. 1600767, 2017.

TARCHEVSKY, I.; YAKOVLEVA, V.; EGOROVA, A. Proteomic analysis of salicylate-induced proteins of pea (*Pisum sativum* L.) leaves. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, n. 5, p. 590-597, 2010.

TEIXEIRA, D.; SPEHAR, C.; SOUZA, L. Agronomic characterization of amaranth for cultivation in the Brazilian Savannah. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 45-51, 2003.

TEWARI, R.; PAEK, K.-Y. Salicylic acid-induced nitric oxide and ROS generation stimulate ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* roots. **Journal of plant growth regulation**, v. 30, n. 4, p. 396-404, 2011.

THAKUR, M. et al. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, 2019.

THALMANN, M. et al. Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants. **The Plant Cell**, v. 28, n. 8, p. 1860-1878, 2016.

THIRUVENGADAM, M. et al. Effects of abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid on the content of phytochemicals and their gene expression profiles and biological activity in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*). **Plant growth regulation**, v. 80, n. 3, p. 377-390, 2016.

THIRUVENGADAM, M.; KIM, S.-H.; CHUNG, I.-M. Exogenous phytohormones increase the accumulation of health-promoting metabolites, and influence the expression patterns of biosynthesis related genes and biological activity in Chinese cabbage (*Brassica rapa* spp. *pekinensis*). **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 136-146, 2015.

TIAN, F. et al. Overaccumulation of glycine betaine makes the function of the thylakoid membrane better in wheat under salt stress. **The Crop Journal**, v. 5, n. 1, p. 73-82, 2017.

TORRES, A. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998.

TSUCHIYA, T. et al. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 26, p. 15362-15367, 1999.

TYSZCZUK, K. Sensitive voltammetric determination of rutin at an in situ plated lead film electrode. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 49, n. 2, p. 558-561, 2009.

UDOMSUK, L. et al. Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 2, p. 369-374, 2011.

VALERIO, C. et al. Thioredoxin-regulated β -amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.2, p.545–555, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN WEES, S.; VAN DER ENT, S.; PIETERSE, C. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 443-448, 2008.

VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant science**, v. 172, n. 5, p. 861-875, 2007.

VELARDE - SALCEDO, A. J. et al. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. **Food chemistry**, v. 136, n. 2, p. 758-764, 2013.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VENSKUTONIS, P.; KRAUJALIS, P. Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 4, p. 381-412, 2013.

VERARDO, V. et al. Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography–electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLC–ESI-TOF-MS). **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 2, p. 170-176, 2010.

VIEIRA, R. et al. Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação in vitro das variedades RB867515 e RB855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, v. 4, n. 1, p. 122-126, 2009.

VILLA, F. et al. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio knudson com adição de vitaminas do meio ms, benzilaminopurina e carvão ativado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, 2014.

VOLP, A.; RENHE, I.; STRINGUETA, P. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.1, p.157-166, 2009.

WADITEE, R. et al. Functional characterization of betaine/proline transporters in betaine-accumulating mangrove. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 21, p. 18373-18382, 2002.

WAFA, A. et al. Plant hosts control microbial denitrification activity. **FEMS Microbiology Ecology**, 2019.

WAHID, A.; GHAZANFAR, A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. **Journal of plant physiology**, v. 163, n. 7, p. 723-730, 2006.

WAHID, A. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. **Journal of plant Research**, v. 120, n. 2, p. 219-228, 2007.

WANG, B. et al. Photosynthesis, sucrose metabolism, and starch accumulation in two NILs of winter wheat. **Photosynthesis research**, v. 126, n. 2-3, p. 363-373, 2015.

WANG, J.; ZHANG, Z.; TAN, R. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum* sp. **Biotechnology letters**, v. 23, n. 11, p. 857-860, 2001.

WANG, J. et al. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 5, 2015.

WANG, K. et al. Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in *Chinese bayberries*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 5809-5815, 2009.

WANG, S.; FU, J. Insights into auxin signaling in plant-pathogen interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, p. 74, 2011.

WANG, Y. et al. Estimating rice chlorophyll content and leaf nitrogen concentration with a digital still color camera under natural light. **Plant Methods**, v. 10, n. 1, p. 36, 2014.

WANG, Y.; JIANG, H. Reconstitution of a branch of the *Manduca sexta* prophenoloxidase activation cascade in vitro: snake-like hemolymph proteinase 21 (HP21) cleaved by HP14 activates prophenoloxidase-activating proteinase-2 precursor. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 10, p. 1015-1025, 2007.

WASTERNAK, C.; HAUSE, B. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. 2002.

WASTERNAK, C.; PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in plant science**, v. 2, n. 8, p. 302-307, 1997.

WASTERNAK, C.; STRNAD, M. Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites—Pathways, transcription factors and applied aspects—A brief review. **New biotechnology**, v. 48, p. 1-11, 2019.

WIND, J.; SMEEKENS, S.; HANSON, J. Sucrose: metabolite and signaling molecule. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14-15, p. 1610-1614, 2010.

WOLDEMARIAM, M. et al. Jasmonoyl-l-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-l-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. **The Plant Journal**, v. 72, n. 5, p. 758-767, 2012.

WONG, S.; LEONG, L.; KOH, J. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food chemistry**, v. 99, n. 4, p. 775-783, 2006.

WOOD, C. W.; REEVES, D. W.; HIMELRICK, D. G. Relationships between chlorophyll meter readings and leaf chlorophyll concentration, N status, and crop yield: a review. In: **Proceedings of the Agronomy Society of New Zealand**. 1993. p. 1-9.

WU, J.; LIN, L. Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 51-57, 2002.

WU, X. et al. The roles of jasmonate signalling in nitrogen uptake and allocation in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant, cell & environment**, v. 42, n. 2, p. 659-672, 2019.

XAVIER, A. et al. Silvicultura clonal: princípios e técnicas. **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, p. 272, 2009.

XIAO, Y. et al. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011.

XU, Z. et al. Glycinebetaine biosynthesis in response to osmotic stress depends on jasmonate signaling in watermelon suspension cells. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1469, 2018.

YAN, Y.; BORREGO, E.; KOLOMIETS, M. Jasmonate biosynthesis, perception and function in plant development and stress responses. **Lipid metabolism. InTech**, p. 393-442, 2013.

YANG, R.-Y.; KEDING, G. Nutritional contributions of important African indigenous vegetables. In: **African indigenous vegetables in urban agriculture**. Routledge, 2009. p. 137-176.

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, n. 3, p. 253-262, 2005.

YAZAKI, K. et al. Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 3, p. 513-524, 2008.

YAZAKI, K. Transporters of secondary metabolites. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 3, p. 301-307, 2005.

YEMM, E.; COCKING, E. Estimation of amino acids by ninhidrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

ZANELLA, M. et al. β -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 6, p. 1819-1826, 2016.

ZHANG, X. et al. Involvement of Arginase in Methyl Jasmonate–induced Tomato Fruit Chilling Tolerance. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 141, n. 2, p. 139-145, 2016.

ZHAO, J.; DAVIS, L.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 4, p. 283-333, 2005.

ZHAO, J.; DIXON, R. The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. **Trends in plant science**, v. 15, n. 2, p. 72-80, 2010.

ZHAO, J.; VERPOORTE, R. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 2-3, p. 435-457, 2007.

ZHAO, S.-Z. et al. Light-regulated betacyanin accumulation in euhalophyte *Suaeda salsa* calli. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 102, n. 1, p. 99-107, 2010.

ZHOU, M.-L. et al. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1229-1239, 2011.

ZŁOTEK, U.; ŚWIECA, M.; JAKUBCZYK, A. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Food chemistry**, v. 148, p. 253-260, 2014.

ZOBAYED, S. A. et al. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 69, n. 2, p. 155-165, 2002.

ZULAK, K. et al. Quantitative ¹H NMR metabolomics reveals extensive metabolic reprogramming of primary and secondary metabolism in elicitor-treated opium poppy cell cultures. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 5, 2008.