



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA – PPGB



Pamela Thaís de Souza Silva

**EFEITO DE ELICITORES BIÓTICOS NA MORFOFISIOLOGIA E NA PRODUÇÃO
DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Lippia alba* (Mill.) CULTIVADAS *IN*
*VITRO***

RECIFE
2021

Pamela Thaís de Souza Silva

**EFEITO DE ELICITORES BIÓTICOS NA MORFOFISIOLOGIA E NA PRODUÇÃO
DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Lippia alba* (Mill.) CULTIVADAS *IN*
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção título de mestre em Botânica.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

Coorientadoras:

Dr^a Lindomar Maria de Souza – CETENE

Dr^a Marciana Bizerra de Morais – UERN

RECIFE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586e

Silva, Pamela Thaís de Souza

Efeito de elicitores bióticos na morfofisiologia e na produção de metabólitos secundários de *Lippia alba* (Mill.)
cultivadas in vitro / Pamela Thaís de Souza Silva. - 2021.
61 f. : il.

Orientadora: Claudia Ulisses de Carvalho .
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Recife,
2021.

1. Micropropagação. 2. Enzimas do estresse antioxidativo. 3. Óleo essencial. 4. Plantas medicinais. I. , Claudia Ulisses
de Carvalho, orient. II. Título

CDD 581

PAMELA THAÍS DE SOUZA SILVA

Efeito de elicitores bióticos na morfofisiologia e na produção de metabólitos secundários de
Lippia alba (Mill.) cultivadas *in vitro*

Presidente da Banca/ Orientadora

Profª Drª Cláudia Ulisses de Carvalho Silva (UFRPE)

Examinadores:

Titulares

Prof. Dr. Marcus Vinícius Loss Sperandio (UFRPE)

Profª Drª Cynthia Cavalcanti de Albuquerque (UERN)

Suplente

Profª Drª Marina Medeiros de Araujo Silva (IFPE)

Profª Drª Natália Maria Corte Real de Castro (UNIBRA)

RECIFE

2021

*Dedico a Deus e a Virgem Maria, que sempre
ouviram minhas orações, e a minha família
que tem me apoiado nessa caminhada,
especialmente a minha mãe.*

Obrigada!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e a Virgem Maria, que colocaram em meu caminho pessoas maravilhosas que me ajudaram, incentivaram e apoiaram nos momentos mais difíceis, e que sempre estiveram lá para falar que iria dar tudo certo, que eu conseguiria vencer todos os obstáculos. E graças a todo esse incentivo consegui vencer as dificuldades que apareceram, por isso, meu muito obrigada a todos vocês.

Agradeço imensamente à minha orientadora, a Prof^a Cláudia Ulisses, que me acolheu em seu grupo de pesquisa desde a graduação, e com sua calma, delicadeza e paciência, ensinou-me a enfrentar as dificuldades da vida acadêmica e da pesquisa. Além disso, apresentou-me a duas pessoas mais até que maravilhosas, as minhas coorientadoras, Lindomar Maria de Souza e Marciana Bizerra de Moraes. Não tenho nem palavras para descrever essas duas mulheres, elas possuem uma luz, uma força e um amor pelo que fazem, que deixa qualquer pessoa encantada. Só tenho o que agradecer por seus ensinamentos e carinho.

Assim como sua líder, os integrantes do Laboratório de Anatomia e Bioquímica de Plantas e do Laboratório de Fisiologia e Cultivo *in vitro* de Plantas são extremamente acolhedores, ao ponto de se tornarem uma segunda família para mim. Muito obrigada, por toda ajuda e apoio: Wellington Carneiro, Marcus Vinícius Loss Sperandio, Flávia Carolina Lins da Silva, Luiz Palhares Neto, Leonardo Silva Santos, Marcos José da Silva Júnior, Henarmmany Cristina Alves de Oliveira, Larisse Bianca Soares Pereira, Layla Fernanda Sousa e Costa, Jessé Elias Marinho de Oliveira, Luzia Inácia de Oliveira Raposo e Yasmim Lopes de Barros.

Fazer pesquisa em um ano tão atípico foi um verdadeiro desafio, devido a todas as dificuldades impostas pela pandemia, por isso agradeço a Layla e seu esposo Diego, Well, Larisse, Nany, Swane, Joilson, Jessé, Neto, Marcos, Prof Marcus e a Profa Cláudia, amigos e colegas que estiveram presentes quando precisei de ajuda para montar o experimento, fazer a coleta e as análises.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcilio Martins de Moraes, ao Prof. Dr. Claudio Augusto Gomes da Câmara e a Lucas, por terem disponibilizado o laboratório para a realização das análises do óleo essencial, e por terem me ensinado e ajudado tanto ao longo da realização dessa análise.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Marcus Vinícius Loss Sperandio, Prof^a Dr^a Cynthia Cavalcanti de Albuquerque, Prof^a Dr^a Marina Medeiros de Araujo Silva e Prof^a Dr^a Natália Maria Corte Real de Castro, agradeço imensamente a sua disponibilidade.

Agradeço também ao apoio da minha família, principalmente a minha mãe, Maria José de Souza Silva, que quando achei que tudo ia dar errado porque não tinha plantas matriz suficiente, ela chega em casa com uma touceira de erva cideira, para renovar as minhas esperanças e me dá forças para continuar. Sua ajuda, assim como a do meu irmão, Bruno de Souza Silva, foi fundamental durante todo o mestrado, especialmente na pandemia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB), desta instituição pela oportunidade de obtenção do título de Mestre. A todos os funcionários do programa, em especial, a Cynara Leleu, por sua gentileza e disponibilidade em nos ajudar. Também agradeço as nossas coordenadoras Profa. Maria Teresa Aureliano Buril Vital e a Profa. Ana Virgínia de Lima Leite.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - *Lippia alba* e os principais componentes do óleo essencial. (A) *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson. Fonte: Ulisses, C. (2019); Estruturas químicas: (B) Citral; (C) Carvona e (D) Linalol. Fonte: National Center for Biotechnology Information (2020) 15

Figura 2- Representação esquemática das possíveis respostas das células à elicitação. R: receptor; PL: fosfolipase; MAPKs: proteínas quinases ativadas por nitrogênio; ROS: espécies reativas de oxigênio; RNS: espécies reativas de nitrogênio; FT: fatores de transcrição. Fonte: Ramirez-Estrada et al. (2016) 19

Figura 3- Representação esquemática das possíveis rotas de síntese de JAs no cloroplasto, peroxissomo e citoplasma. LOX: lipoxigenase; AOS: óxido aleno sintase; AOC: óxido aleno ciclase; OPR3: redutase OPDA; JAR1: jasmonato resistente 1; JMT: JA carboxil metiltransferase; OPDA: ácido 12-oxo-fitodienóico; dnOPDA: ácido dinor-12-oxo-fitodienóico; OPC8: 8- (3-oxo-2- (pent- Ácido 2-enil) ciclopentil) octanoico; OPC6: ácido 6- (3-oxo-2- (pent-2-enil) ciclopentil) hexanoico; OPC4: 4- (3-oxo-2- (pent-2-enil) ácido ciclopentil) butanoico; tnOPDA: tetranor-OPDA; 4,5-ddh-JA: 4,5-didesidrijasmonato, JA: ácido jasmônico; JA-Ile: jasmonoil-L-isoleucina e MeJa: metil jasmonato. Fonte: Adaptado de Ruan et al. (2019)..... 20

MANUSCRITO

Figura 1 - Altura de plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 2 - Biomassa Foliar de plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético)..... 10

- Figura 3 – Comprimento Radicular de plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético). 10
- Figura 4 - Biomassa Radicular de plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético). 11
- Figura 5 – Número de nós de plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético)..... 12
- Figura 6 - Número de Folhas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético)..... 12
- Figura 7 – Análise de Componentes Principais (ACP) de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). NF: Número de Folhas; NB: Número de Nós; BF: Biomassa Foliar; CR: Comprimento Radicular; BR: Biomassa Radicular..... 13
- Figura 8– Atividade da superóxido dismutase (SOD) (U SOD mg^{-1} proteína) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores..... 14
- Figura 9 – Atividade da Ascorbato peroxidase (APX) ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores..... 15
- Figura 10 – Atividade da catalase (CAT) ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores. 15
- Figura 11 – Teor de Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa fresca) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores..... 16

Figura 12– Teor de Malondialdeído (MDA) (nmol g^{-1} de massa fresca) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores. 17

Figura 13 – Teor de Proteínas Solúveis Totais (mg/mL) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). 17

Figura 14 – Análise de Componentes Principais (ACP) de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias) 17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual dos compostos encontrados no óleo essencial de <i>Lippia alba</i> submetidas a 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliados ao final do experimento (34 dias).	19
--	----

Sumário

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
Características da <i>Lippia alba</i>	14
Cultivo <i>in vitro</i>	16
Utilização de Elicitores Bióticos	18
Metil Jasmonato	19
Quitosana	21
Extrato de Levedura	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
Manuscrito	1
Efeito de elicitores bióticos na fisiologia, sistema redox e na composição de metabólitos secundários de <i>Lippia alba</i> (Mill.) cultivadas <i>in vitro</i>	2
RESUMO	2
Introdução	2
Metodologia	4
Material vegetal e condições do experimento	4
Avaliações Biométricas	5
Análises Bioquímicas	5
<i>Proteínas solúveis totais e enzimas antioxidantes</i>	5
<i>Peróxido de hidrogênio e Malondialdeído</i>	6
Análise Qualitativa do Óleo Essencial	7
Análises Estatísticas	8
RESULTADOS	8
<i>Biometria</i>	8
<i>Bioquímica</i>	13
<i>Composição do óleo essencial</i>	18
DISCUSSÃO	24
Conclusão	26
REFERÊNCIAS	26

RESUMO

O gênero *Lippia* pertence à família Verbenaceae e apresenta cerca de 200 espécies distribuídas na América do Sul, Central e na África. A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex P. Wilson é ocorrente no semiárido nordestino brasileiro, suas folhas são ricas em óleo essencial o qual apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante comprovada, com relevância na indústria farmacológica e cosmética. Neste sentido, a micropropagação surge como uma técnica de multiplicação *in vitro* de plantas, por meio do qual os explantes são introduzidos em meio nutritivo, que pode ser suplementado com substâncias conhecidas como elicitores, que visam modulações no crescimento e na produção de metabólitos secundários nas plantas desenvolvidas *in vitro*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da aplicação de elicitores no desenvolvimento *in vitro* e na produção de compostos secundários em *Lippia alba*. Para isso, inicialmente foi realizada a inoculação de segmentos nodais da espécie em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da força iônica. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após a fase de estabelecimento, as plantas foram repicadas e inoculadas em potes, contendo 50 mL do meio MS semissólido acrescido de metil jasmonato (0, 100, 200 e $300 \mu\text{M L}^{-1}$), quitosana ou extrato de levedura nas concentrações de: 0, 200, 400 e 600 mg L^{-1} , durante 5 dias ou 10 dias. Depois desse período os segmentos nodais (explantes) foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio MS na ausência do elicitor onde permaneceram por 25 dias. Observou-se que a elicitação durante 10 dias afetou o crescimento e desenvolvimento das plantas, e que a adição de 400 e/ou 600 mg L^{-1} de quitosana e 400 mg L^{-1} de extrato de levedura por 5 dias ao meio promoveu o aumento da altura e biomassa foliar das plantas. Além disso, as plantas elicidadas com quitosana apresentaram maior número de compostos no perfil de óleo essencial em comparação aos outros elicitores e ao controle. Neste contexto, para elicitação *in vitro* de *L. alba* indicamos a aplicação de 400 e/ou 600 mg L^{-1} de quitosana no meio de cultivo por 5 dias, pois essas concentrações proporcionaram aumento no crescimento das plantas, além de melhores estratégias para a produção de metabólitos secundários.

Palavras-chave: Micropropagação; Enzimas do estresse antioxidativo; Óleo essencial; Plantas medicinais.

ABSTRACT

The genus *Lippia* belongs to the Verbenaceae family and has about 200 species distributed in South, Central America and Africa. The species *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex P. Wilson is found in the Brazilian Northeast semiarid; its leaves are rich in essential oil and have proven antimicrobial and antioxidant activity, with relevance in the pharmaceutical and cosmetic industry. In this sense, micropropagation appears as a technique for in vitro multiplication of plants, where explants are introduced in a nutrient medium, which can be supplemented with substances known as elicitors, which aim at modulations in the growth and production of secondary metabolites in plants developed in vitro. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of the application of elicitors on in vitro development and on the production of secondary compounds in *Lippia alba*. Initially, young cuttings containing nodal segments were removed from parent plants and the process of asepsis started. Then, the nodal segments (1 cm) containing two lateral buds were inoculated in MS medium (Murashige & Skoog, 1962) with half the ionic strength. The explants were kept in a growth room at $25 \pm 2^\circ$ C and a 16-hour photoperiod. After the establishment phase, the plants were seeded and inoculated in pots, containing 50 mL of the semi-solid MS medium plus methyl jasmonate (0, 100, 200 and 300 $\mu\text{M L}^{-1}$), chitosan or yeast extract in the concentrations of: 0, 200, 400 and 600 mg L^{-1} , for 5 days or 10 days. After that period, the nodal segments (explants) were transferred to test tubes containing MS medium in the absence of the elicitor where they remained for 25 days and subsequently the biometric, biochemical, anatomical parameters and quantitative analysis of the essential oil were evaluated. The quantitative data of the experiment were submitted to ANOVA and compared by the Scott-Knott test at 5% probability. It was observed that the elicitation for 10 days affected the growth and development of the plants, and that the addition of 400 and / or 600 mg L^{-1} of chitosan and 400 mg L^{-1} of yeast extract for 5 days in the medium promoted the increase in plant height and leaf biomass. In addition, the plants elicited with chitosan showed a higher number of compounds in the essential oil profile compared to the other elicitors and to the control. In this context, for in vitro elicitation of *L. alba* we indicate the application of 400 and / or 600 mg L^{-1} of chitosan in the culture medium for 5 days, as these concentrations provided an increase in the growth of the plants, in addition to better strategies to produce secondary metabolites.

Keywords: Micropropagation; Enzymes of antioxidative stress; Essential oil; Medicinal plants.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas produzem vários compostos que têm significativo potencial para aplicação nas indústrias químico-farmacêuticas (RAMIREZ-ESTRADA et al. 2016), como é o caso das espécies do gênero *Lippia*. Esse gênero pertence à família Verbenaceae e apresenta 200 espécies, das quais, 18 são consideradas raras ou ameaçadas de extinção, por causa da fragmentação de habitats, ocasionada pela exploração agrícola, agropecuária e garimpeira, além do extrativismo das espécies com potencial farmacológico (MARTINELLI & MORAES 2013; MARTINELLI et al. 2014).

Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson, popularmente conhecida como erva cidreira (Figura 1), é nativa do território brasileiro com distribuição nas Américas Central e do Sul, África e no sul dos Estados Unidos (HENNEBELLE et al. 2008). *L. alba* é um arbusto aromático, onde suas folhas são usadas para o tratamento de doenças respiratórias, resfriados, gripe, hipertensão, além de doenças gastrointestinais (HENNEBELLE et al. 2008a). As propriedades farmacêuticas do óleo essencial dessa espécie são conferidas principalmente pela presença de: citral, carvona e linalol (JULIÃO et al., 2003; HENNEBELLE et al. 2008a; BLANK et al. 2015; TREVISAN et al. 2016). Estes compostos conferem ao óleo essencial atividade antimicrobiana, antioxidante e anestésica (HENNEBELLE et al. 2008; NOVAES SIMÕES et al. 2017; BATISTA et al. 2018; JOSHI et al. 2018).

A composição química do óleo essencial pode ser influenciada quantitativamente e qualitativamente por fatores edafoclimáticos, fatores genéticos e estágio de desenvolvimento da planta (GOBBO-NETO & LOPES 2007; VASCONSUELO & BOLAND 2007; GOUVEA et al. 2012). Sendo assim, o desenvolvimento vegetal através do cultivo *in vitro* tem sido considerado como uma maneira de melhorar o rendimento de metabólitos secundários de forma controlada e em larga escala (PANDEY et al. 2017).

Além disso, o cultivo *in vitro* promove a produção sustentável de metabólitos secundários, com rigoroso controle de produção e qualidade, garantindo que o material vegetal não estará contaminado por microrganismos fitopatogênicos, além de apresentar independência de flutuações geográficas ou ambientais (RAMIREZ-ESTRADA et al. 2016). Essa técnica também pode favorecer a aclimação, aumentando a capacidade de tolerância aos estresses bióticos e abióticos, além de promover a conservação de espécies (THORPE 2007; IDOWU 2009; HUSSAIN et al. 2012; PANDEY et al. 2017).

Entretanto, a quantidade de metabólitos secundários produzidos pelas plantas cultivadas *in vitro* ainda é reduzida, por isso, faz-se necessária a utilização de elicitores (RAMIREZ-ESTRADA et al. 2016). Essas substâncias são usadas para desencadear respostas

morfológicas e fisiológicas, que possibilitam o aumento na produção e no acúmulo de metabólitos secundários, devido às respostas de defesa da planta (ORLITA et al. 2008; PATEL e KRISHNAMURTHY 2013; DIAS et al. 2016). Dentre os elicitores bióticos usados para essa finalidade estão o metil jasmonato, a quitosana e o extrato de levedura (RAMIREZ-ESTRADA et al. 2016).

Diante do exposto, o presente estudo tem como hipótese que a aplicação exógena de elicitores como a quitosana, o extrato de levedura e o metil jasmonato, podem promover modulações no crescimento e aumento da produção de metabólitos secundários em *Lippia alba*. Portanto, esse trabalho tem como objetivo, avaliar a influência de elicitores no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de *Lippia alba* com a finalidade de promover o aumento da produção de compostos secundários.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Características da *Lippia alba*

A família Verbenaceae contém 100 gêneros distribuídos principalmente na América do Norte e do Sul, nas regiões temperadas e tropicais quentes (O'LEARY et al. 2012). O gênero *Lippia* apresenta cerca de 200 espécies distribuídas na América do Sul, Central e na África (MUNIR 1993; SALIMENA 2010). No Brasil, podem ser encontradas 88 espécies, sendo 68 endêmicas, estando distribuídas na Região Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (SALIMENA & MULGURA 2015). Diversas espécies desse gênero apresentam propriedades medicinais comprovadas, sendo utilizadas popularmente para o tratamento de resfriados, gripe, bronquite, tosse e asma, além de doenças gastrointestinais e cutâneas (PASCUAL et al. 2001; PIMENTA et al. 2007).

Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson (1993) popularmente conhecida como erva cidreira, é uma espécie nativa do Brasil, que pode ser encontrada em todos os domínios fitogeográficos do país, assim como nas Américas Central e do Sul, África, no sul dos Estados Unidos e na Austrália (HENNEBELLE et al. 2008; SALIMENA & MULGURA 2015). Essa espécie apresenta porte arbustivo com altura variando entre 0,6 a 2m, suas folhas são opostas com tricomas glandulares, além de inflorescências globosas a cilíndricas de coloração arroxeada (Figura 1) (SALIMENA e MULGURA 2015).

Devido à sua ampla distribuição e à semelhança entre as espécies do gênero *Lippia*, *L. alba* apresenta 29 sinônimos (SALIMENA & MULGURA 2015) e é provavelmente uma das espécies mais estudadas do ponto de vista farmacológico (HENNEBELLE et al. 2008a). Dentre as propriedades mais estudadas desta espécie destacam-se as atividades antibacteriana e

antifúngica (MACHADO et al. 2014; SANTOS et al. 2016; TOMAZONI et al. 2016; Batista et al. 2018), antiviral (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al. 2005; OCAZIONEZ et al. 2010), antiprotozoária (CALZADA et al. 2006; BALDISSERA et al. 2017), neurossedativa (HENNEBELLE et al. 2006; HENNEBELLE et al. 2008b; HATANO et al. 2012; NOVAES SIMÕES et al. 2017), analgésica e anti-inflamatória (SIQUEIRA-LIMA et al. 2019), antioxidante (STASHENKO et al. 2004; HENNEBELLE et al. 2008b; JOSHI et al. 2018) e citotóxica (COSTA et al. 2004).

Na medicina tradicional, a espécie é usada para o tratamento de ansiedade, hipertensão, anemia, cólicas, diarreia, flatulência, náusea, febre, resfriado, tosse, bronquite e asma (PASCUAL et al. 2001; DI STASI et al. 2002; HENNEBELLE et al. 2008a). Essas propriedades medicinais devem-se, às propriedades do óleo essencial, que apresenta uma composição variável devido à sua plasticidade morfofisiológica em relação às condições ambientais, sugerindo a existência de vários quimiotipos, mas no geral seus principais componentes são: citral, carvona e linalol (Figura 1) (JULIÃO et al. 2003; HENNEBELLE et al. 2008a; BLANK et al. 2015; TREVISAN et al. 2016).

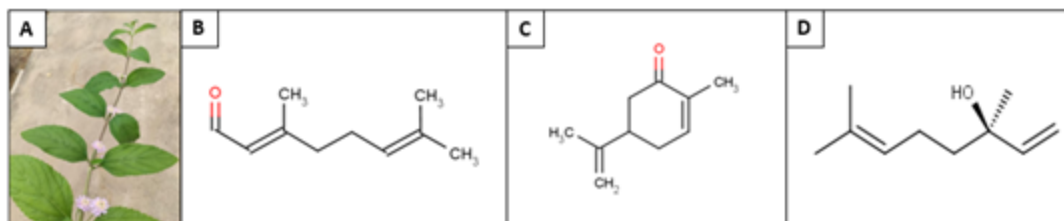


Figura 1 - *L. alba* e os principais componentes do óleo essencial. (A) *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson. Fonte: Ulisses, C. (2019); Estruturas químicas: (B) Citral; (C) Carvona e (D) Linalol. Fonte: National Center for Biotechnology Information (2020).

O citral é um aldeído da série monoterpene, formado da mistura isomérica de geranial e neral (BAKKALI et al. 2008), que apresenta atividades antibacteriana e antifúngica (SADDIQ e KHAYYAT 2010; LU et al. 2018; USACH et al. 2020) e inseticida (TAK & ISMAN 2016). A carvona é uma cetona da série monoterpene (BAKKALI et al. 2008) que pode ser purificada nos enantiômeros R - (-) ou S - (+), e apresenta atividade inseticida (EL-MINSHAWY et al. 2018), fungicida (PEIXOTO et al. 2018), antibacteriana (GUIMARÃES et al. 2019), além de combater a citotoxicidade acarretada pelo estresse oxidativo do nervo óptico e da retina em ratos (CINICI et al. 2019). O linalol é um álcool da série monoterpene (BAKKALI et al. 2008), que apresenta atividade antifúngica (SILVA et al. 2017), antibacteriana (GUIMARÃES et al. 2019), bem como propriedades ansiolíticas, ou seja, atua no combate a ansiedade (SOUTO-MAIOR et al. 2011).

A composição química do óleo essencial pode ser influenciada por fatores edafoclimáticos, fatores genéticos e estágio de desenvolvimento da planta (GOBBO-NETO & LOPES 2007; VASCONSUELO & BOLAND 2007; GOUVEA et al. 2012). Por exemplo, o aumento da concentração de linalol foi observado quando plantas de *L. alba* foram cultivadas *in vitro* sob fotoperíodo de 24 horas (CASTRO et al. 2019), e quando submetidas a 60mM de NaCl (CASTRO et al. 2020).

Algumas espécies do gênero *Lippia* estão ameaçadas de extinção devido à fragmentação de habitats, ocasionada pela exploração agrícola, agropecuária e garimpeira, além do extrativismo de espécies com potencial farmacológico (MARTINELLI & MORAES 2013; MARTINELLI et al. 2014). Diante do potencial medicinal apresentado por *L. alba* e dos entraves enfrentados no manejo sustentável e na conservação dessa espécie, faz-se necessária a busca por novas técnicas biotecnológicas que aumentem a produção de mudas e de metabólitos secundários de forma sustentável, como o cultivo *in vitro* de plantas.

Cultivo *in vitro*

A cultura de tecidos ou cultivo *in vitro* de plantas é uma ferramenta biotecnológica que abrange diversas técnicas que permite que células, tecidos, órgãos ou a planta inteira, sejam cultivadas em meio de cultura sob condições assépticas tendo o controle da luminosidade, umidade e temperatura, para promover a produção e/ou melhoramento das plantas (THORPE 2007; SMETANSKA 2008; HUSSAIN et al. 2012). Essa técnica foi proposta por Gottlieb Haberlandt em 1902, por meio de experimentos realizados com cultura de células individuais, e é baseada principalmente no conceito de totipotência das células vegetais, que é a capacidade de uma célula se regenerar e formar uma nova planta (THORPE 2007; HUSSAIN et al. 2012). Mas foi apenas em 1922 que o primeiro cultivo de células foi desenvolvido com sucesso por Kolte e Robbins, quando cultivaram pontas de raiz e caule (DIAS et al. 2016).

A descoberta mais importante para a cultura de tecidos ocorreu em 1962 por Murashige e Skoog, que foi o desenvolvimento do meio MS (MURASHIGE & SKOOG 1962) para culturas de células de tabaco, que consistia em macro e micronutrientes, uma fonte principal de carbono (sacarose, por exemplo), vitaminas do complexo B e reguladores de crescimento. Nesse meio, os pesquisadores conseguiram combinar todos os requisitos nutricionais satisfatórios para um grande grupo de espécies de plantas, de modo que várias publicações apontam o meio MS como um dos mais eficientes em trabalhos de micropropagação, beneficiando a agricultura e o meio ambiente.

O cultivo *in vitro* é baseado na seleção da planta-mãe, estabelecimento da cultura asséptica, multiplicação dos propágulos e aclimatização (GAURAV et al. 2018). Para o estabelecimento da cultura, faz-se necessária a utilização de um meio de cultura, que tenha água e nutrientes minerais (macronutriente e micronutrientes), fonte de carbono e vitaminas indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento das plantas (DIAS et al. 2016). Já na etapa de multiplicação, ocorre o subcultivo dos órgãos por um determinado tempo sob condições assépticas em novos meios de cultura. Após todo processo *in vitro*, é necessário que as plântulas passem pelo processo de aclimatização que é o processo de adaptação das plântulas *ex vitro*, onde as condições ambientais não são totalmente controladas (KUMAR & REDDY 2011).

A técnica de cultivo *in vitro* surgiu como uma ferramenta de pesquisa, mas a partir de meados do século XX, tornou-se uma técnica de aplicação industrial, sendo utilizada para micropropagação (IDOWU 2009). A micropropagação é uma técnica da cultura de tecidos vegetais utilizada para a produção de plantas em larga escala em um curto período (BHATIA et al. 2015). Atualmente, é utilizada como uma ferramenta para a realização de embriogênese somática, hibridização somática, indução de resistência a doenças e pragas, aumentar a capacidade de tolerância aos estresses bióticos e abióticos, propagação de plantas em larga escala e conservação de espécies (THORPE 2007; IDOWU 2009; HUSSAIN et al. 2012).

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta importante para a conservação *ex situ*, pois auxilia na preservação de espécies raras ou ameaçadas de extinção (SARASAN 2010). Além disso, as plantas propagadas *in vitro* podem ser usadas para reintrodução ou aumento de populações selvagens (PENCE 2011).

O desenvolvimento de plantas através do cultivo *in vitro* tem sido considerado como uma maneira econômica de melhorar o rendimento de metabólitos secundários em larga escala (PANDEY et al. 2017). Por isso, tem-se investido em pesquisas sobre o uso de substâncias, como os elicitores, que estimulam o crescimento e desenvolvimento das plantas e consequentemente a produção de metabólitos secundários *in vitro*. Muitos trabalhos já vêm sendo realizados nessa área, principalmente com plantas medicinais como, *Thevetia peruviana* (MENDOZA et al. 2018), *Hypericum perforatum* (WANG et al. 2015), *Gymnema sylvestre* (CHODISETTI et al. 2015), *Polygonum minus* (HASSAN et al. 2018), *Carum copticum* (RAZAVIZADEH et al. 2020) e *Cayratia trifolia* (ROAT & RAMAWAT 2009).

Com relação a *Lippia alba* pesquisas apontam que a exposição dessa espécie a condições adversas, como fotoperíodo de 24 horas e a salinidade (60mM de NaCl), *in vitro* podem influenciar a produção e composição de metabólitos secundários (CASTRO et al. 2019;

CASTRO et al. 2020). Entretanto, ainda são poucos os trabalhos relacionados ao uso de diferentes elicitores em *L. alba*, bem como sobre o conhecimento acerca das respostas metabólicas dessa espécie submetidas a diferentes substâncias, diante disso, faz-se necessário o investimento em pesquisas sobre o uso de elicitores *in vitro*.

Utilização de Elicitores Bióticos

Os elicitores são substâncias usadas para desencadear respostas morfológicas e fisiológicas, possibilitando o aumento na produção e no acúmulo de metabólitos secundários, atuando como mecanismos de defesa da planta (ORLITA et al. 2008; PATEL & KRISHNAMURTHY 2013; DIAS et al. 2016).

Os elicitores podem ser classificados quanto a sua origem em abióticos e bióticos. Os abióticos são substâncias inorgânicas, como sais e íons metálicos (Cu, Cd, Ca²⁺, AlCl₃, CaCl₂, CdCl₂ e CoCl₂), além de fatores físicos como o pH alto, por exemplo (NAMDEO 2007; RAMIREZ-ESTRADA et al. 2016). Enquanto os elicitores bióticos são substâncias de origem orgânica, que compreendem moléculas como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos, além de polissacarídeos derivados da parede celular de plantas e microrganismos (pectina ou celulose, quitina ou glucanos) (BARBOSA & MEDEIROS, NAMDEO 2007). Os elicitores bióticos podem ser divididos em endógenos e exógenos. Os elicitores endógenos são compostos produzidos pelas plantas após a percepção do estresse, enquanto os elicitores exógenos são substâncias introduzidas na planta (NAMDEO 2007, RAMIREZ-ESTRADA et al. 2016).

A resposta de defesa da planta ao elicitor pode desencadear diferentes rotas metabólicas, assim como pode se iniciar na membrana plasmática ou no citosol, isso vai depender do tipo de elicitor utilizado. Na membrana plasmática ocorre a percepção do elicitor pelo receptor, seguida pela fosforilação reversível e desfosforilação de proteínas da membrana plasmática e proteínas citosólicas, promovendo a entrada de Ca²⁺ e H⁺ e saída de Cl⁻ e K⁺, o que favorece a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e da NADPH oxidase. Em seguida, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS), o que aciona a expressão precoce de genes de defesa, o metabolismo secundário, e impulsiona a produção de jasmonatos, que ativa a expressão gênica da resposta de defesa tardia e o acúmulo de metabólitos secundário (Figura 2) (RAMIREZ-ESTRADA et al. 2016). Vale salientar, que este é um mecanismo geral de ação dos elicitores, sendo assim diferentes elicitores podem possuir rotas distintas.

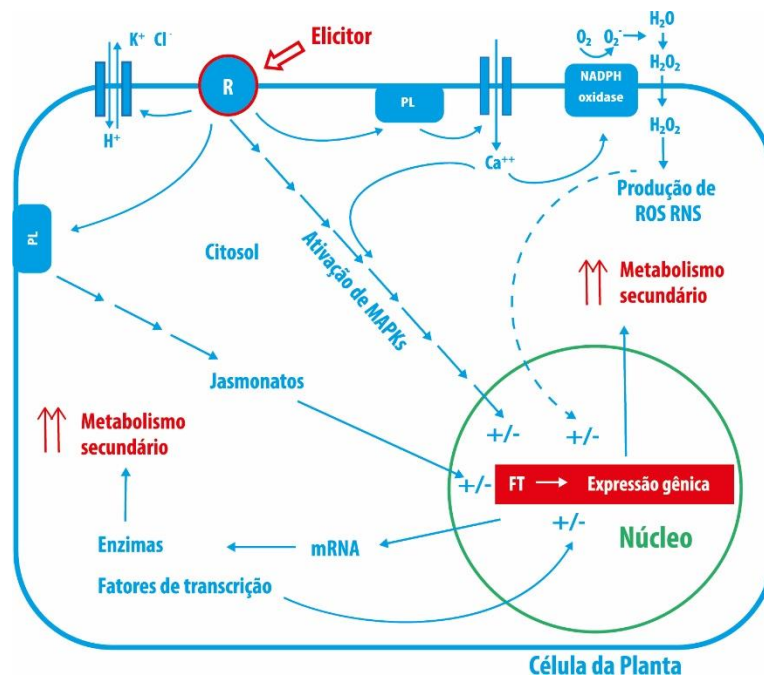


Figura 2 - Representação esquemática das possíveis respostas das células à elicitação. R: receptor; PL: fosfolipase; MAPKs: proteínas quinases ativadas por mitogênio; ROS: espécies reativas de oxigênio; RNS: espécies reativas de nitrogênio; FT: fatores de transcrição. Fonte: Ramirez-Estrada et al. (2016).

Vários elicitores têm sido empregados com a finalidade de estimular mecanismos de defesa, aumentando a produção de metabólitos secundários (ORLITA et al. 2008), dentre estes o metil jasmonato, a quitosana e o extrato de levedura.

Metil Jasmonato

Os jasmonatos (JAs), como são conhecidos coletivamente o ácido jasmônico (JA) e seu éster metílico, metil jasmonato (MeJa) e conjugado de isoleucina (JA-Ile), são compostos de sinalização, derivados de lipídios (RUAN et al. 2019, WASTERACK 2015). A síntese de JAs, pode ocorrer por meio da via do octadecano a partir do ácido α -linolênico e da via do hexadecano a partir do ácido hexadecatrienoico, precisando de três locais de reação: o cloroplasto, o peroxissomo e o citoplasma. A síntese de ácido 12-oxo-fitodienóico (12-OPDA) ou ácido diênico vegetal desoximetilado (dn-OPDA) a partir de ácido graxo insaturado ocorre no cloroplasto, que é então convertido em JA no peroxissomo. No citoplasma, o JA é metabolizado em diferentes estruturas por várias reações químicas, como MeJa, JA-Ile, *cis*-jasmona (CJ) e ácido 12-hidroxi-jasmônico (12-OH-JA) (Figura 3) (RUAN et al. 2019).

Por ser uma molécula sinalizadora específica de plantas, o MeJa, pode atuar como um sinal chave para a expressão gênica de defesa, principalmente contra estresses bióticos, além de influenciar os processos de desenvolvimento e decrescimento, como a formação de raízes

laterais e adventícias, germinação de sementes, senescência de folhas, formação de tricomas glandulares e desenvolvimento de embriões e pólen (DEUNER et al. 2015, WASTERNAK 2015, RAMIREZ-ESTRADA et al. 2016).

A cultura de suspensão de células de *Thevetia peruviana* elicitada com 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MeJa apresentou aumento de 1,49 vezes no teor de compostos fenólicos em relação ao controle. Esses compostos apresentam potencial antimicrobiano e antineoplásico. Comprovou-se também, aumento de 1,66 vezes na atividade antioxidante e 2,55 vezes no conteúdo de flavonoides em comparação ao controle. Os flavonoides dessa planta são responsáveis pela inibição da enzima integrase e a transcriptase reversa associada à polimerase do DNA do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 (MENDOZA et al. 2018).

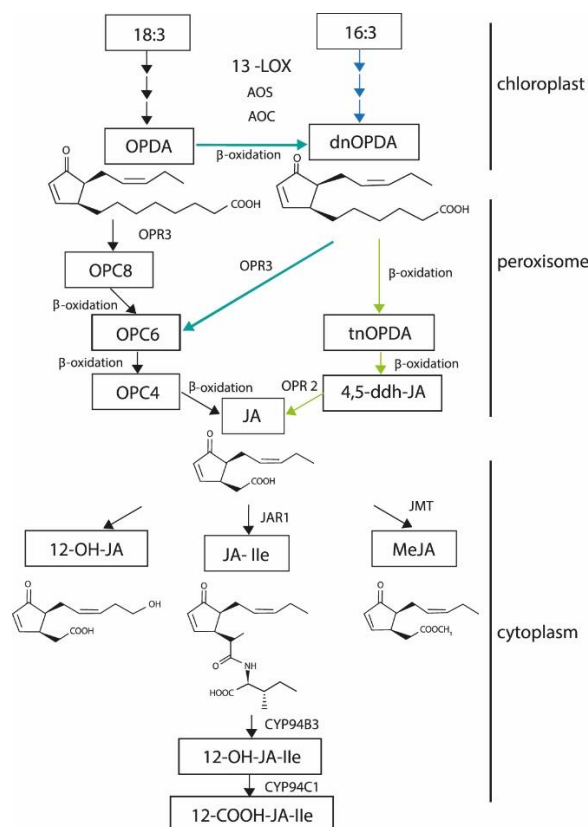


Figura 3 - Representação esquemática das possíveis rotas de síntese de JAs no cloroplasto, peroxissomo e citoplasma. LOX: lipoxigenase; AOS: óxido aleno sintase; AOC: óxido aleno ciclase; OPR3: redutase OPDA; JAR1: jasmonato resistente 1; JMT: JA carboxil metiltransferase; OPDA: ácido 12-oxo-fitodienóico; dnOPDA: ácido dinor-12-oxo-fitodienóico; OPC8: 8- (3-oxo-2- (pent- Ácido 2-enil) ciclopentil) octanoico; OPC6: ácido 6- (3-oxo-2- (pent-2-enil) ciclopentil) hexanoico; OPC4: 4- (3-oxo-2- (pent-2-enil) ácido ciclopentil) butanoico; tnOPDA: tetranor-OPDA; 4,5-ddh-JA: 4,5-didesidrjasmonato, JA: ácido jasmônico; JA-Ile: jasmonoil-L-isoleucina e MeJa: metil jasmonato. Fonte: Adaptado de Ruan et al. (2019).

Fagopyrum tataricum, popularmente conhecida como trigo sarraceno, após ser elicitada *in vitro* com MeJa nas concentrações de 1 e 10 μmol , apresentou um aumento na

formação de compostos fenólicos. Além disso, observou-se que em concentrações crescentes de MeJa, o acúmulo de compostos fenólicos foi acompanhado pelo declínio na atividade antioxidante, resultado contrário ao observado por Mendoza et al. (2018), provavelmente devido ao aumento do estresse oxidativo na cultura de suspensão de células (GUMEROVA et al. 2015).

A espécie *Hypericum perforatum*, usada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de feridas na pele, eczema, queimaduras, doenças do trato alimentar e distúrbios psicológicos, apresentou uma maior produção de flavonoides (280 mg L^{-1}) após ser elicitada *in vitro* com $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de MeJa. Além disso, o tratamento com MeJa inibiu as atividades da catalase (CAT), enquanto aumentou as atividades da fenilalanina amônia liase, o que promoveu o aumento da produção desses flavonoides. Esses flavonoides, especificamente a quercetina e seus derivados glicosídeos, constituem o principal grupo de metabólitos biologicamente ativos e são marcadores bioquímicos importantes na autenticação de materiais vegetais à base de plantas (WANG et al. 2015).

A atividade biológica do MeJa é altamente variável e dependente de sua concentração nos tecidos ou no meio de cultura de células vegetais (SOARES & MACHADO 2007). Na cultura de suspensão de células de *Gymnema sylvestre*, observou-se que quando elicitada com $150 \text{ } \mu\text{mol}$ de MeJa, a concentração de ácido gimnêmico foi 15,4 vezes maior em comparação ao controle, mas quando ultrapassou essa concentração ocorreu uma redução de 36,3% na concentração do ácido. Os ácidos gimnêmicos são usados para a produção de medicamentos antidiabéticos (CHODISETTI et al. 2015).

Ainda não há trabalhos na literatura relacionados ao uso de MeJa em *L. alba in vitro* ou em casa de vegetação. Entretanto, Moreno-Rodríguez et al. (2019) relataram que a aplicação do ácido jasmônico nas folhas *Lippia origanoides* possibilitou a formação de novos tricomas glandulares local e sistemicamente, assim como o aumento significativo de timol e carvacrol. Isso destaca a necessidade de mais pesquisas sobre respostas metabólicas de *L. alba* ao uso de elicitores.

Quitosana

A quitosana (QT) é um polissacarídeo importante para a composição estrutural da parede celular de vários fungos patogênicos de plantas, sendo obtida por meio da desacetilação parcial da quitina sólida, em condições alcalinas ou por hidrólise enzimática com a quitina desacetilase (GALLÃO et al. 2010; FERRI & TASSONI, 2011; RAMIREZ-ESTRADA et al. 2016). O mecanismo de ação desse polissacarídeo ainda não foi totalmente desvendado, mas

sabe-se que após o reconhecimento da QT por receptores celulares específicos, os mensageiros secundários devem transduzir o sinal para induzir respostas fisiológicas. Os mensageiros secundários podem ser espécies reativas de oxigênio (ROS), H_2O_2 , Ca^{2+} , óxido nítrico (NO) e fitormônios (Figura 4) (MALERBA & CERANA, 2016; HIDANGMAYUM et al. 2019). Esses mensageiros podem promover a resistência aos estresses bióticos e abióticos, a síntese de oligossacarídeos, induzir enzimas antioxidantes e regular o uso da água (HIDANGMAYUM et al. 2019).

A QT aumenta as respostas fisiológicas de defesa e diminui os efeitos adversos dos estresses bióticos e abióticos, por meio da indução de enzimas de defesa (como fenilalanina amônia liase e peroxidase), síntese de metabólitos secundários (como polifenólicos, lignina, flavonoides e fitoalexinas), produção de ácidos orgânicos e açúcares, além de estimular a formação e deposição de calose (FERRI & TASSONI 2011; MALERBA & CERANA, 2016; HIDANGMAYUM et al. 2019).

A utilização de quitosana como elicitor fez com que plantas de *Ruta graveolens* L. cultivadas *in vitro* apresentassem aprimoramento na taxa de crescimento, bem como aumento na biossíntese de cumarinas simples, furanocumarinas lineares, diidrofuranocumarinas e alcaloides (ORLITA et al. 2008).

Hypericum perforatum, popularmente conhecida como erva de São João ao ser elicitada *in vitro* com 200mg L^{-1} quitosana, não foi favorecida quanto ao aumento de biomassa, no entanto os níveis de valina, isoleucina, glutamina, ácido γ -aminobutírico, frutose, sacarose, ácidos graxos poliinsaturados, epicatequina, xantonas, dimetilalilpirofosfato e estigmasterol aumentaram, enquanto os níveis de histidina diminuíram. Essa resposta aponta para uma mudança metabólica em direção ao armazenamento de compostos de carbono e nitrogênio, como sacarose e aminoácidos, além de refletir um processo de adaptação às condições de estresse induzidas pelo tratamento com quitosana (BRASIL et al. 2014).

A cultura de suspensão de células de *Decalepis salicifolia* quando elicitada com $200\mu\text{mol L}^{-1}$ de quitosana apresentou aumento de biomassa, conteúdo fenólico, flavonoides e 2-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (2H4MB) em comparação ao controle e ao extrato de levedura. O 2H4MB é um isômero estrutural da vanilina, com alto valor farmacológico e usado como agente aromatizante em nível industrial para a fabricação de refrigerantes e produtos de panificação (AHMAD & SHARMA 2019).

A cultura de suspensão de células de *Carum copticum*, espécie que apresenta atividade antimicrobiana e antisséptica, devido à presença de compostos fenólicos, flavonoides e monoterpenos como timol, terpeno, p-quimeno e β -pineno, quando elicitada com 20 mg L^{-1}

quitosana apresentou um aumento na produção de timol e p-quimeno. No entanto, a quitosana suprimiu o acúmulo fenólico e as atividades de enzimas antioxidantes sob tratamento com NaCl (RAZAVIZADEH et al. 2020).

Extrato de Levedura

O extrato de levedura (EL) é produzido pela digestão desse microrganismo por enzimas exógenas ou endógenas ou em condições ácidas (RAMIREZ-ESTRADA ET AL. 2016). Esse elicitor é considerado rico em vitaminas do complexo B, além de conter quitina, oligômeros de N-acetil-glucosamina, β -glucano, glicopeptídeos e ergosterol, esses compostos estimulam as respostas de defesa da planta, desencadeando a síntese de metabólitos (MAQSOOD & ABDUL 2017). Assim como outros elicitores, a concentração e o tempo de exposição ao EL são fatores importantes na biossíntese de metabólitos, e seu nível ideal pode ser diferente para cada espécie de planta (KOCHAN et al. 2017).

A elicitação *in vitro* com $1,5\text{g L}^{-1}$ de extrato de levedura em *Catharanthus roseus*, promoveu aumento no rendimento dos antineoplásicos vimblastina e vincristina, compostos com atividade anticancerígena (MAQSOOD & ABDUL 2017).

A cultura de suspensão de células de *Cayratia trifolia* quando elicitada com 500 mg L^{-1} de extrato de levedura apresentou aumento no crescimento, nos teores de estilbenos, viniferina e ampelopsina, os quais estão associados a atividades antioxidantes, anticancerígenas e antiaterosclerose (ROAT & RAMAWAT 2009).

A cultura de raízes pilosas de *Silybum marianum*, quando elicitada com $2,5\text{ mg mL}^{-1}$ de extrato de levedura por 72 h, apresentou maior concentração de silimarina, composto que apresenta atividade anticancerígena, neurodegenerativa, gastrointestinais, sendo utilizada no tratamento cardiopulmonar e dermatológico (HASANLOO et al. 2008).

Estudos sobre os efeitos dos elicitores no metabolismo secundário das plantas *in vitro*, além de permitirem o aprimoramento do conhecimento das vias de atuação dessas moléculas nas plantas, favorecem a produção sustentável de compostos secundários, devido às condições ambientais controladas *in vitro*, colaborando de maneira direta com a indústria de produtos terapêuticos, meio ambiente e a sociedade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Zishan; SHAHZAD, Anwar; SHARMA, Shiwali. Chitosan versus yeast extract driven elicitation for enhanced production of fragrant compound 2-hydroxy-4-

methoxybenzaldehyde (2H4MB) in root tuber derived callus of *Decalepis salicifolia* (Bedd. ex Hook. f.) Venter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 136, n. 1, p. 29-40, 2019.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, CR1 et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian atlantic tropical forest. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3-4, p. 374-378, 2005.

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

BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALDISSERA, Matheus D. et al. Trypanocidal action of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* essential oils against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 2, p. 345-351, 2017.

BARBOSA, ALEX DA SILVA; MEDEIROS, MARCOS BARROS. Potencial de ação elicitora dos biofertilizantes líquidos na indução de resistência sistêmica vegetal. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, 2007.

BATISTA, Andressa et al. Modulatory Effect of *Lippia alba* Essential Oil on the Activity of Clinically Used Antimicrobial Agents on Salmonella typhi and Shigella dysenteriae Biofilm. **Scientia Pharmaceutica**, v. 86, n. 4, p. 52, 2018.

BHATIA, Saurabh et al. Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences. Academic Press, 2015.

BLANK, Arie Fitzgerald et al. Chemical diversity in *Lippia alba* (Mill.) NE Brown germplasm. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

BRASIL, Elisa et al. A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum* *in vitro* roots. **Metabolomics**, v. 10, n. 6, p. 1186-1196, 2014.

CALZADA, Fernando; YÉPEZ-MULIA, Lilian; AGUILAR, Abigail. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 367-370, 2006.

CASTRO, Kamila Motta et al. Photoperiod modulates growth, morphoanatomy, and linalool content in *Lippia alba* L.(Verbenaceae) cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 139, n. 1, p. 139-153, 2019.

- CASTRO, Kamila Motta et al. Salinity modulates growth, morphology, and essential oil profile in *Lippia alba* L.(Verbenaceae) grown *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 140, n. 3, p. 593-603, 2020.
- CHODISETTI, Bhuvaneshwari et al. Gymnemic acid enhancement in the suspension cultures of *Gymnema sylvestris* by using the signaling molecules—methyl jasmonate and salicylic acid. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 1, p. 88-92, 2015.
- CINICI, Emine et al. Carvone protects against paclitaxel-induced retinal and optic nerve cytotoxicity: a histopathological study. **Cutaneous and ocular toxicology**, v. 38, n. 3, p. 290-293, 2019.
- COSTA, M. C. C. D.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C. Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 349-352, 2004.
- DEUNER, Cristiane et al. Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 275-281, 2015.
- DI STASI, L. C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69-91, 2002.
- DIAS, Maria Inês et al. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial crops and products**, v. 82, p. 9-22, 2016.
- EL-MINSHAWY, Abdelaziz M. et al. Effects of monoterpenes on mortality, growth, fecundity, and ovarian development of *Bactrocera zonata* (Saunders)(Diptera: Tephritidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 16, p. 15671-15679, 2018.
- FERRI, Maura; TASSONI, Annalisa. Chitosan as elicitor of health beneficial secondary metabolites in *in vitro* plant cell cultures. **Handbook of Chitosan Research and Applications**. Nova Science Publishers, New York, p. 389-414, 2011.
- GALLÃO, Maria Izabel et al. Biochemical and morphological responses to abiotic elicitor chitin in suspension-cultured sugarcane cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 253-260, 2010.
- GAURAV, Naveen et al. A review on *in vitro* propagation of medicinal plants. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 6, p. 2228-2231, 2018.
- GUIMARÃES, Aline Cristina et al. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2471, 2019.
- GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOUVEA, Dayana R.; GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. The influence of biotic and abiotic factors on the production of secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives** (V. Cechinel-Filho, eds.), p. 419-452, 2012.

GUMEROVA, E. A.; AKULOV, A. N.; RUMYANTSEVA, N. I. Effect of methyl jasmonate on growth characteristics and accumulation of phenolic compounds in suspension culture of tartary buckwheat. **Russian journal of plant physiology**, v. 62, n. 2, p. 195-203, 2015.

HASANLOO, Tahereh et al. The Influence of yeast extract on the production of flavonolignans in hairy root cultures of *Silybum marianum* L. Gaertn. In: **4th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering 2008**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 358-361.

HATANO, Viviane Yumi et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 238-243, 2012.

HENNEBELLE, Thierry et al. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. **Chemistry & biodiversity**, v. 3, n. 10, p. 1116-1125, 2006.

HENNEBELLE, Thierry et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008a.

HENNEBELLE, Thierry et al. Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 22, n. 2, p. 256-258, 2008b.

HIDANGMAYUM, Akash et al. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, n. 2, p. 313-326, 2019.

HUSSAIN, Altaf et al. Plant tissue culture: current status and opportunities. **Recent advances in plant in vitro culture**, p. 1-28, 2012.

IDOWU, P. E.; IBITOYE, D. O.; ADEMOYEGUN, O. T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, 2009.

JOSHI, Archana et al. Chemical Analysis and Antioxidant Activity of Essential Oils of Two Morphotypes of *Lippia alba* (Mill.) NE Br. ex Britton & P. Wilson (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 3, p. 687-700, 2018.

- JULIÃO, L. S. et al. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) NE Br (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 36-38, 2003.
- KOCHAN, Ewa et al. Yeast extract stimulates ginsenoside production in hairy root cultures of American ginseng cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactors. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 880, 2017.
- KUMAR, Nitish; REDDY, M. P. *In vitro* plant propagation: a review. **Journal of forest and environmental science**, v. 27, n. 2, p. 61-72, 2011.
- LU, Wen-Chien et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 1, p. 82-89, 2018.
- MACHADO, Terezinha Feitosa et al. The antimicrobial efficacy of *Lippia alba* essential oil and its interaction with food ingredients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 699-705, 2014.
- MALERBA, Massimo; CERANA, Raffaella. Chitosan effects on plant systems. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 7, p. 996, 2016.
- MAQSOOD, Mehpara; ABDUL, Mujib. Yeast extract elicitation increases vinblastine and vincristine yield in protoplast derived tissues and plantlets in *Catharanthus roseus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 5, p. 549-556, 2017.
- MARTINELLI, Gustavo; MORAES, Miguel Avila. Livro vermelho da flora do Brasil. 2013, p. 1010-1013.
- MARTINELLI, Gustavo; MESSINA, Tainan; SANTOS FILHO, Luiz. Livro vermelho da flora do Brasil: plantas raras do Cerrado. 2014. p. 266-268.
- MENDOZA, Dary et al. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. **Biotechnology reports**, v. 19, p. e00273, 2018.
- MORENO-RODRÍGUEZ, Amanda et al. Effect of jasmonic acid on major terpenes and density of glandular trichomes in *Lippia graveolens* kunth (Verbenaceae). **Natural product research**, v. 34, n. 13, p. 1942-1946, 2020.
- MUNIR, Ahmad Abid. A taxonomic revision of the genus *Lippia* [Houst. ex] Linn.(Verbenaceae) in Australia. **Journal of the Adelaide Botanic Garden**, p. 129-145, 1993.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

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

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Citral, CID=638011. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Citral>>. Acesso em 07 abril de 2020.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Carvone, CID=7439. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvone>> Acesso em 07 abril de 2020.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Linalool, CID=6549. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linalool>> Acesso em 07 abril de 2020.

NOVAES SIMÕES, Larissa et al. Essential oil of *Lippia alba* as a sedative and anesthetic for the sea urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 50, n. 3, p. 205-217, 2017.

OCAZIONEZ, Raquel Elvira et al. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 304-309, 2010.

O'LEARY, Nataly et al. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, n. 2, p. 197-219, 2012.

ORLITA, Aleksandra et al. Application of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and furoquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L. (common rue). **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 91-96, 2008.

PANDEY, Vibha et al. *Withania somnifera*: advances and implementation of molecular and tissue culture techniques to enhance its application. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1390, 2017.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

PATEL, Heena; KRISHNAMURTHY, R. Elicitors in plant tissue culture. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 2, p. 60-65, 2013.

PEIXOTO, Magna Galvão et al. Activity of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against phytopathogenic fungi. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 5, 2018.

- PENCE, Valerie C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 47, n. 1, p. 176-187, 2011.
- PIMENTA, Maiana R. et al. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 2, p. 211-220, 2007.
- RAMIREZ-ESTRADA, Karla 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.
- RAZAVIZADEH, Roya; ADABAVAZEH, Fatemeh; KOMATSU, Setsuko. Chitosan effects on the elevation of essential oils and antioxidant activity of *Carum copticum* L. seedlings and callus cultures under *in vitro* salt stress. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 473-483, 2020.
- ROAT, Chetana; RAMAWAT, K. G. Elicitor-induced accumulation of stilbenes in cell suspension cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin. **Plant Biotechnology Reports**, v. 3, n. 2, p. 135-138, 2009.
- RUAN, Jingjun et al. Jasmonic acid signaling pathway in plants. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 2479, 2019.
- SADDIQ, Amna A.; KHAYYAT, Suzan A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, n. 1, p. 89-93, 2010.
- SALIMENA, Fátima Regina Gonçalves. Uma nova espécie de *Lippia* L. (Verbenaceae) do cerrado brasileiro. **Acta bot. bras**, p. 232-234, 2010.
- SALIMENA, F. R. G.; MULGURA, M. *Lippia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15171>, 2015.
- SANTOS, Nara O. dos et al. Cytotoxic and antimicrobial constituents from the essential oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Medicines**, v. 3, n. 3, p. 22, 2016.
- SARASAN, Viswambharan. Importance of *in vitro* technology to future conservation programmes worldwide. *Kew Bulletin*, v. 65, n. 4, p. 549, 2010.
- SILVA, Kaltz VS et al. Inhibitory effects of linalool on fungal pathogenicity of clinical isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. **Mycoses**, v. 60, n. 6, p. 387-393, 2017.
- SIQUEIRA-LIMA, Pollyana S. et al. Central nervous system and analgesic profiles of *Lippia* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 125-135, 2019.
- SMETANSKA, Iryna. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In: **Food biotechnology**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 187-228.

- SOARES, Alexandra Martins Santos; MACHADO, Olga Lima Tavares. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 10, 2007.
- SOUTO-MAIOR, Flávia Negromonte et al. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 2, p. 259-263, 2011.
- STASHENKO, Elena E.; JARAMILLO, Beatriz E.; MARTÍNEZ, Jairo René. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 1, p. 93-103, 2004.
- TAK, Jun-Hyung; ISMAN, Murray B. Metabolism of citral, the major constituent of lemongrass oil, in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and effects of enzyme inhibitors on toxicity and metabolism. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 133, p. 20-25, 2016.
- THORPE, Trevor A. History of plant tissue culture. **Molecular biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 169-180, 2007.
- TOMAZONI, Elisa Z. et al. *In vitro* antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils against *Alternaria solani* (Pleosporaceae) isolates. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 2, p. 999-1010, 2016.
- TREVISAN, Maria TS et al. Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: identification, quantitation and antioxidant capacity. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 4, p. 485, 2016.
- USACH, Iris et al. Comparison between Citral and Pompia Essential Oil Loaded in Phospholipid Vesicles for the Treatment of Skin and Mucosal Infections. **Nanomaterials**, v. 10, n. 2, p. 286, 2020.
- VASCONSUELO, Andrea; BOLAND, Ricardo. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v. 172, n. 5, p. 861-875, 2007.
- WANG, Jing 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.
- WASTERNAK, Claus. How jasmonates earned their laurels: past and present. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 4, p. 761-794, 2015.

Manuscrito**Efeito de elicitores bióticos na fisiologia, sistema redox e na composição de metabólitos secundários de *Lippia alba* (Mill.) cultivadas *in vitro***

Pamela Thaís de Souza Silva, Lindomar Maria de Souza, Marciana Bizerra de Moraes, Marcilio Martins de Moraes, Claudio Augusto Gomes da Camara, Cláudia Ulisses.

Artigo a ser submetido a "South African Journal of Botany", Qualis A3, Percentil 67%.



Efeito de elicitores bióticos na fisiologia, sistema redox e na composição de metabólitos secundários de *Lippia alba* (Mill.) cultivadas *in vitro*

Pamela Thaís de Souza Silva¹, Lindomar Maria de Souza², Marciana Bizerra de Moraes³,
Marcilio Martins de Moraes⁴, Claudio Augusto Gomes da Camara⁴, Cláudia Ulisses⁵.

RESUMO

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex P. Wilson é ocorrente no semiárido nordestino brasileiro, suas folhas são ricas em óleo essencial que apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante comprovada, com relevância na indústria farmacológica e cosmética. Sendo assim, este estudo avaliou a influência de elicitores no desenvolvimento *in vitro* e na produção de compostos secundários em *Lippia alba*. Para isso, estacas de *L. alba* foram inoculadas em meio MS semissólido acrescido de metil jasmonato (0, 100, 200 e 300 $\mu\text{M L}^{-1}$), quitosana ou extrato de levedura nas concentrações de: 0, 200, 400 e 600 mg L^{-1} , durante 5 dias ou 10 dias. Observou-se que a elicitação durante 10 dias afetou o crescimento e desenvolvimento das plantas, e que a adição de 400 e/ou 600 mg L^{-1} de quitosana e 400 mg L^{-1} de extrato de levedura por 5 dias ao meio promoveu o aumento da altura e biomassa foliar das plantas. Além disso, as plantas elicidadas com quitosana apresentaram maior número de compostos no perfil de óleo essencial em comparação aos outros elicitores e ao controle. Neste contexto, para elicitação *in vitro* de *L. alba* indicamos a aplicação de 400 e/ou 600 mg L^{-1} de quitosana no meio de cultivo por 5 dias, pois essas concentrações proporcionaram aumento no crescimento das plantas, além de melhores estratégias para a produção de metabólitos secundários.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Micropropagação; Enzimas do estresse antioxidativo; Óleo essencial.

¹Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 52171-900, Brasil. pamelathais194@gmail.com

²Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife - PE, 50740-545, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró - RN, 59610-210, Brasil.

⁴Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 52171-900, Brasil.

⁵Departamento de Biologia, Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 52171-900, Brasil.

Introdução

A *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson (Verbenaceae) é uma das espécies mais estudadas do ponto de vista farmacológico (HENNEBELLE et al. 2008). Trata-se de uma espécie nativa do Brasil e que pode ser encontrada em todos os seus domínios fitogeográficos,

bem como no sul dos Estados Unidos, na Austrália, nas Américas Central e Sul e na África (HENNEBELLE et al. 2008; SALIMENA & MULGURA 2015).

Dentre as propriedades mais estudadas de *L. alba* destacam-se as atividades antibacteriana e antifúngica (MACHADO et al. 2014; TOMAZONI et al. 2016), neurosedativa (NOVAES SIMÕES et al. 2017), analgésica e anti-inflamatória (SIQUEIRA-LIMA et al. 2019) e antioxidante (JOSHI et al. 2018). Na medicina tradicional, a espécie é usada para o tratamento de ansiedade, hipertensão, anemia, cólicas, diarreia, flatulência, náusea, febre, resfriado, tosse, bronquite e asma (PASCUAL et al. 2001; DI STASI et al. 2002; HENNEBELLE et al. 2008a).

As propriedades atribuídas a *L. alba* existem graças ao subproduto do seu metabolismo secundário, do qual é proveniente o óleo essencial extraído de diversas partes da planta, principalmente das folhas. Outra característica marcante dessa espécie é a plasticidade morfofisiológica ocasionada pelas condições ambientais, que proporcionam a existência de vários quimiotipos (GOBBO-NETO & LOPES 2007; VASCONSUELO & BOLAND 2007; GOUVEA et al. 2012). No geral os principais componentes do óleo essencial dessa espécie são: citral, carvona e linalol (JULIÃO et al. 2003; HENNEBELLE et al. 2008a; BLANK et al. 2015; TREVISAN et al. 2016).

Devido a produção de compostos que têm potencial na indústria químico-farmacêutica, por *L. alba*, tem-se investido em pesquisas sobre o uso de substâncias conhecidas como elicitores. Essas substâncias, podem desencadear o aumento na produção e no acúmulo de metabólitos secundários, mediante respostas de defesa da planta a um determinado estresse (AHMAD et al. 2019). Assim, essas substâncias podem estimular o crescimento e o desenvolvimento das plantas e conseqüentemente a produção de metabólitos secundários (ORLITA et al. 2008; PATEL & KRISHNAMURTHY 2013; DIAS et al. 2016).

Alguns trabalhos já vêm sendo realizados nessa área, principalmente com plantas medicinais como, *Thevetia peruviana* (MENDOZA et al. 2018), *Hypericum perforatum* (WANG et al. 2015), *Gymnema sylvestre* (CHODISETTI et al. 2015), *Carum copticum* (RAZAVIZADEH et al. 2020) e *Cayratia trifolia* (ROAT & RAMAWAT 2009). Porém, ainda são poucos os trabalhos relacionados ao uso de diferentes elicitores em *L. alba* e conseqüentemente é escasso o conhecimento acerca das respostas metabólicas dessa espécie à exposição de diferentes substâncias. Por isso, faz-se necessário o investimento em pesquisas sobre o uso de elicitores *in vitro*. Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo, avaliar a influência da aplicação de elicitores no desenvolvimento *in vitro*, no sistema de defesa antioxidante e na produção de compostos secundários em *Lippia alba*.

Metodologia

Material vegetal e condições do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia e Cultivo in vitro de Plantas (LFC-Planta) e as análises foram realizadas no Laboratório de Anatomia e Bioquímica de Plantas (LAB-Planta), ambos pertencentes ao Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

As plantas matrizes de *L. alba* foram coletadas no município de Camaragibe-PE, e cultivadas no laboratório em um sistema hidropônico com solução nutritiva de Hoagland com 100% da força iônica e 1mL L⁻¹ de hipoclorito de sódio, com a finalidade de controle fitossanitário. Cada sistema hidropônico tinha cerca de 50 estacas e 10 L de solução nutritiva. O volume da solução era aferido a cada dois dias.

Foram retirados dessas plantas ramos contendo os 3 primeiros segmentos nodais (o segmento apical e os dois segmentos abaixo deste), como fonte de explantes. Esses ramos passaram por processos de assepsia, iniciando por uma lavagem em água corrente por 20 minutos e posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram submetidos a uma solução de álcool etílico a 70% por 1 minuto sob agitação, em seguida foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2% com 50 µL de Tween® 20, onde permaneceram por 8 minutos sob agitação. Em seguida, os ramos foram enxaguados três vezes com água deionizada esterilizada, para remover o agente desinfestante.

Posteriormente, os ramos foram seccionados em segmentos nodais (explantes) medindo aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo duas gemas laterais opostas e inoculados em tubos de ensaio (15cm x 2,5cm) contendo 15 mL do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da concentração iônica dos sais, suplementados com 15 g L⁻¹ de sacarose, 2,5 g L⁻¹ de phytigel, 0,5 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) e 1 mL L⁻¹ de Preservative for Plant Tissue Culture Media (PPM). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos. Os tubos de ensaio foram fechados com papel de filtro quantitativo (faixa branca C40; porosidade entre 4 e 7 µm). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2°C com fotoperíodo de 16 horas. Após a fase de estabelecimento (30 dias), as plantas foram repicadas e inoculadas em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL do meio MS semissólido com metade da força iônica, com os mesmos compostos supracitados, acrescido de metil jasmonato (MeJa) (0, 100, 200 e 300 µM L⁻¹), quitosana (QT) (0, 200, 400 e 600 mg L⁻¹) ou extrato de levedura (EL) (0, 200, 400 e 600 mg L⁻¹), durante 5 dias e 10 dias. Além de dois controles, controle A (controle para todos os

tratamentos) e controle B (controle específico para o tratamento com ácido acético, pois esse ácido foi o utilizado para dissolver a quitosana). Após o período de elicitação (5 e 10 dias), os segmentos nodais foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio MS com a metade da concentração dos sais, na ausência do elicitor, permanecendo nessa condição por mais 29 dias, os que tiveram 5 dias de elicitação, e 24 dias, os que tiveram 10 dias de elicitação, totalizando 34 dias de experimento. Após esse período foram avaliados os parâmetros biométricos, bioquímicos e a análise qualitativa do óleo essencial. Foi utilizado um delineamento experimental fatorial (3x4x2), com 3 repetições de 10 unidades experimentais por repetição. Cada unidade experimental foi composta por um tubo de ensaio contendo uma única planta.

Avaliações Biométricas

Foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da parte aérea (cm), comprimento da maior raiz (cm), número de folhas e de brotos e a massa fresca da parte aérea e radicular. Essas variáveis foram aferidas com o auxílio de uma régua e uma balança analítica.

Análises Bioquímicas

Proteínas solúveis totais e enzimas antioxidantes

Ao final do experimento foram coletados 100 mg de tecido vegetal fresco proveniente de três repetições de cada tratamento. O material vegetal foi homogeneizado com nitrogênio líquido em 1 mL de tampão fosfato de sódio 100mM (pH 7,5) com 20% polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm a uma temperatura de 4°C durante 30 minutos (modificado de ZERAIK et al. 2008). O sobrenadante foi utilizado para determinar o conteúdo de proteínas solúveis totais (BRADFORD 1976) e a atividade das enzimas catalase (HAVIR & MCHALE 1987; AZEVEDO et al. 1998), ascorbato peroxidase (NAKANO & ASADA 1981) e superóxido dismutase (GIANNOPOLITIS & RIES 1977; AZEVEDO et al. 1998).

Quantificação de Proteínas Solúveis Totais

A concentração das proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1876), utilizando-se o BSA (Bovine Serum Albumin) como padrão. A reação foi realizada com adição de 20 µL de amostra (previamente diluída) a 1 mL do reagente de Bradford e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos.

Atividade da catalase (CAT, EC 1. 11. 1. 6)

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Havir e Mchale (1987) com modificações conforme Azevedo et al. (1998). Em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 μ L de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 25 μ L do extrato proteico e a atividade determinada seguindo a decomposição do H_2O_2 por 60 segundos, através das alterações a 240 nm, sob temperatura de 25°C, em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em μ mol/mg de proteínas/min, considerando uma unidade de catalase decompõe 1 μ mol de H_2O_2 por mg de proteína em 1 minuto a pH 7,5.

Atividade da Ascorbato peroxidase (APX, EC 1. 11. 1.1)

A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Nakano e Asada (1981). O meio de reação composto por 650 μ L de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,5, 100 μ L de ascorbato 5 mM, 100 μ L de EDTA 1 M, 100 μ L de H_2O_2 1 mM e 50 μ L do extrato protéico. A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a 30°C, durante 60 segundos, em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em μ mol/mg de proteínas/min, considerando que uma unidade da atividade da APX foi definida como a conversão de 1 μ M de ácido ascórbico em monodehidroascorbato durante um minuto.

Atividade de superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

O protocolo foi padronizado de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), com modificações descritas por Azevedo et al. (1998). Por esse método, é determinada a inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo formazana. A solução de reação (3 mL) foi constituída de 85 mM de tampão fosfato (pH 7,8), 75 μ M de NBT, 5 μ M riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM EDTA e 50 μ L de extrato enzimático. A solução foi adicionada em tubos de vidro e irradiada com luz branca (lâmpada fluorescente de 15W) por 10 minutos. Após esse período de exposição, a solução foi analisada por espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a formação de formazana por grama de proteína, com resultados expressos em U/mg de proteína.

Peróxido de hidrogênio e Malondialdeído

O teor do peróxido de hidrogênio foi quantificado segundo protocolo de Alexieva et al. (2001), em que as amostras frescas foram maceradas com ácido tricloroacético (TCA) 0,1%,

na relação de 1 g/10 mL (w:v) e posteriormente centrifugadas a 10.000g por 15 minutos, a 4°C. Do sobrenadante, foi retirado 200 µL e adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de iodeto de potássio. As amostras permaneceram em gelo e no escuro durante uma hora. Após este período, as amostras foram retiradas do gelo e mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação e, em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

Para a realização da análise de malondialdeído, após a homogeneização foi retirado do sobrenadante 0,25 mL e transferido para outro tubo juntamente com 1,0 mL de solução contendo 20% de TCA e 0,5% de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi mantida em banho-maria a 95°C durante 30 minutos, em seguida passou por rápido resfriamento por 10 minutos. Antes da leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm, as amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos a 10.000g (modificado de HEATH & PACKER 1968).

Análise Qualitativa do Óleo Essencial

A análise do óleo essencial foi conduzida no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, pertencente ao Departamento de Química da UFRPE.

Análise GC-FID de óleos essenciais

As análises quantitativas de GC foram realizadas usando um aparelho PerkinElmer Clarus 500 GC equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 não polar (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (J & W Scientific). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240 ° C a uma taxa de 3 ° C min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram de 260 ° C. O hidrogênio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹ em modo dividido (1:30). O volume de injeção foi de 1,0 µL de solução diluída (1/100) de óleo em n-hexano. A quantidade de cada composto foi calculada a partir das áreas dos picos de GC-FID na ordem da eluição da coluna DB-5 e expressa como uma porcentagem relativa da área total dos cromatogramas.

Análise GC-MS

As análises qualitativas por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) foram realizadas usando um sistema cromatográfico CG-EM QP2010 SE Plus Shimadzu com detector seletivo de massa, espectrômetro de massa em EI 70 eV com intervalo de varredura de 0,5 de fragmentos de 40 a 550 Da. equipado com a mesma coluna e programa de temperatura dos experimentos GC-FID, com os seguintes parâmetros: gás portador = hélio; taxa de fluxo = 1

mL min⁻¹; modo de divisão (1:30); injetado no autoinjeter AOC-20i um volume = 1 µL de solução diluída (1/100) de óleo em n-hexano.

Identificação de componentes

A identificação dos componentes foi baseada em índices de retenção de GC-MS com referência a uma série homóloga de C8-C40 n-alcenos calculados usando a equação de Van der Dool e Kratz (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963) e por computador comparando a massa espectral com a biblioteca do sistema de dados GC-MS (NIST 14 e WILEY 14°) e co-injeção com padrões autênticos, bem como outros espectros de massa publicados (ADAMS, 2017). As porcentagens de área foram obtidas a partir da resposta do GC-FID sem o uso de um padrão interno ou fatores de correção.

Análises Estatísticas

Os dados quantitativos do experimento foram submetidos à ANOVA e comparados pelo teste de Scott-Knott (SK) a 5% de probabilidade, assim como a Análise de Componentes Principais (ACP) no Software R (R CORE TEAM, 2017) com pacote agrícola (MENDIBURU, 2017).

RESULTADOS

Biometria

A elicitação durante 5 dias promoveu o aumento significativo na altura de *Lippia alba* cultivada *in vitro* em todas as concentrações com QT, enquanto o EL promoveu maior comprimento da parte aérea (altura) nas concentrações de 400 e 600 mg L⁻¹ (Figura 1). A biomassa foliar foi significativa nas maiores concentrações de QT e na concentração intermediária (400 mg L⁻¹) do EL (Figura 2).

As plantas submetidas aos elicitores por 10 dias, apresentaram menor crescimento em todos os tratamentos, principalmente nas concentrações de 100 e 300 µM L⁻¹ de MeJa e 400 e 600 mg L⁻¹ de QT, quando comparadas com as plantas elicidadas por 5 dias (Figura 1 e 2).

Quanto ao desenvolvimento radicular, observou-se que os maiores tamanhos das raízes foram obtidos no controle A, bem como nos tratamentos com QT (200 mg L⁻¹) nos dois períodos de elicitação (5 e 10 dias) e com 600 mg L⁻¹ com 5 dias de elicitação. Já com o EL, as concentrações que promoveram maior comprimento radicular foram as maiores (400 e 600 mg L⁻¹), nas plantas elicidadas por 5 dias (Figura 3). A biomassa radicular foi afetada negativamente em todos os tratamentos com o uso dos elicitores (Figura 4).

O número de nós no caule nas concentrações de 400 e 600 mg L⁻¹ de QT foi maior em plantas elicitadas por 5 dias, enquanto no EL foi maior em todas as concentrações quando elicitadas por 5 dias, no entanto na concentração de 200 mg L⁻¹ também foi maior quando as plantas foram elicitadas por 10 dias. Já o número de folhas foi maior nos tratamentos de 600 mg L⁻¹ QT elicitado por 5 dias e 200 mg L⁻¹ de EL elicitado por 10 dias (Figura 6). Os explantes que receberam o MeJa como elicitador, apresentaram variáveis biométricas inferiores quando comparadas aos demais tratamentos (Figuras 1, 2, 3, 5 e 6), exceto para a variável biomassa radicular que se equiparou aos demais tratamentos quando submetidos a elicitação por 5 dias (Figura 4).

A Análise de Componentes Principais (ACP), mostrou que aproximadamente 78,1% da variação encontrada pode ser explicada pelos parâmetros biométricos (Figura 7). Pode-se observar que o Número de Folhas (NF) e o Número de Nós (NB) estão correlacionados positivamente, isso significa que os tratamentos com maior número de nós, tendem a apresentar um maior número de folhas. Assim como, a Biomassa Foliar (BF), Comprimento Radicular (CR), Altura e Biomassa Radicular (BR) estão correlacionados positivamente.

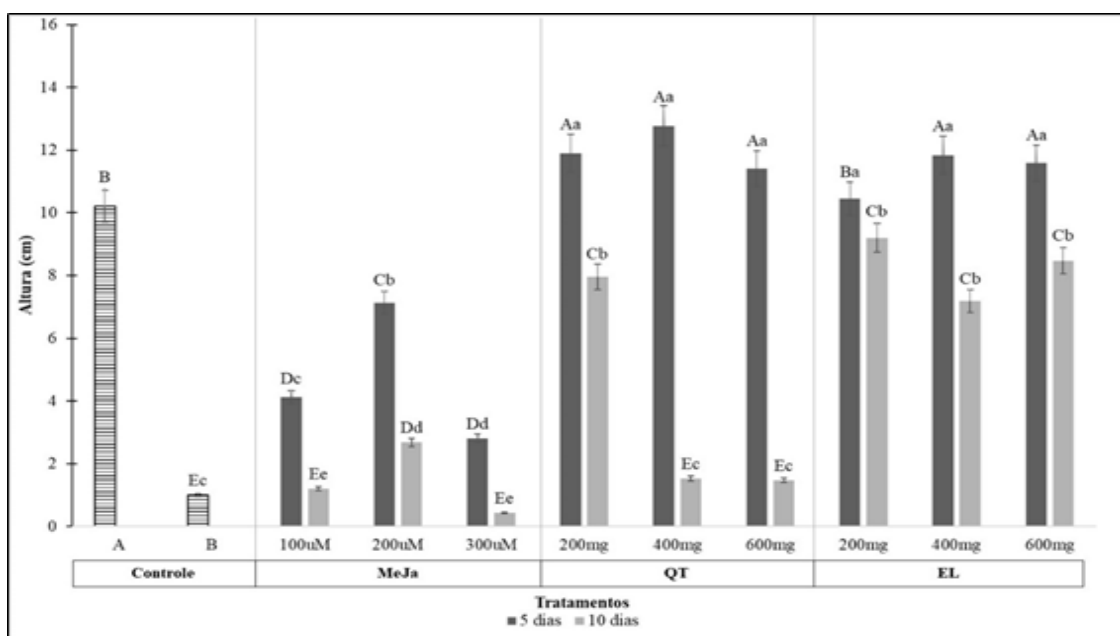


Figura 1 - Altura de plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético).

As letras maiúsculas comparam entre os elicitores e o tempo de elicitação e as letras minúsculas entre as concentrações do mesmo elicitador e o tempo de elicitação. As médias (n=3) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

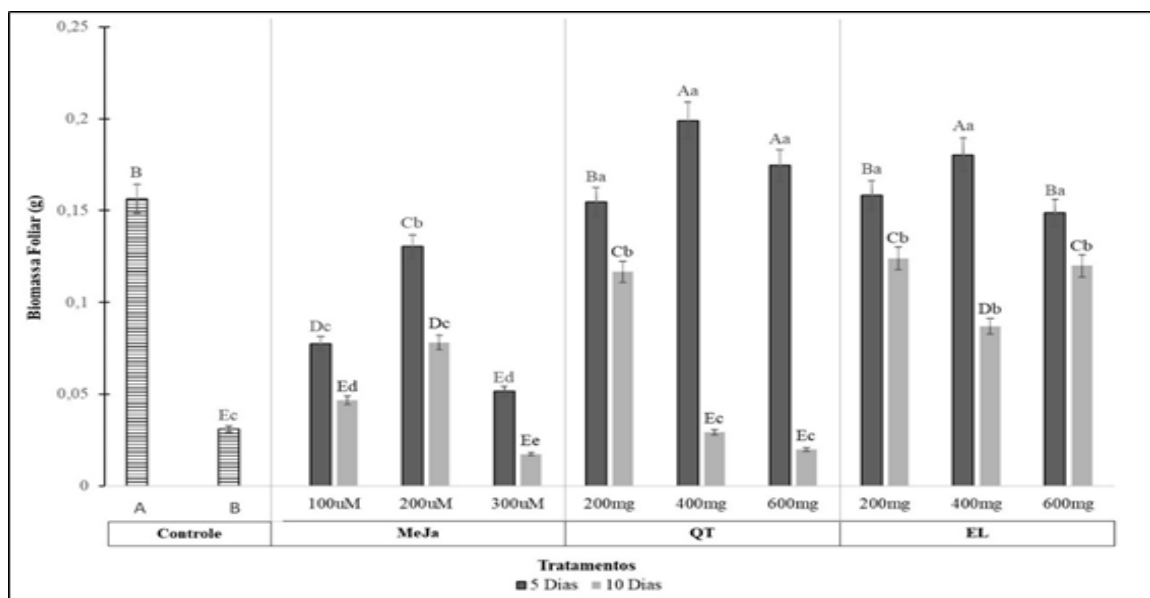


Figura 1 - Biomassa da parte aérea de plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores; controle B: meio nutritivo com a adição de ácido acético).

As letras maiúsculas comparam entre os elicitores e o tempo de elicitação e as letras minúsculas entre as concentrações do mesmo elicitor e o tempo de elicitação. As médias (n=3) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

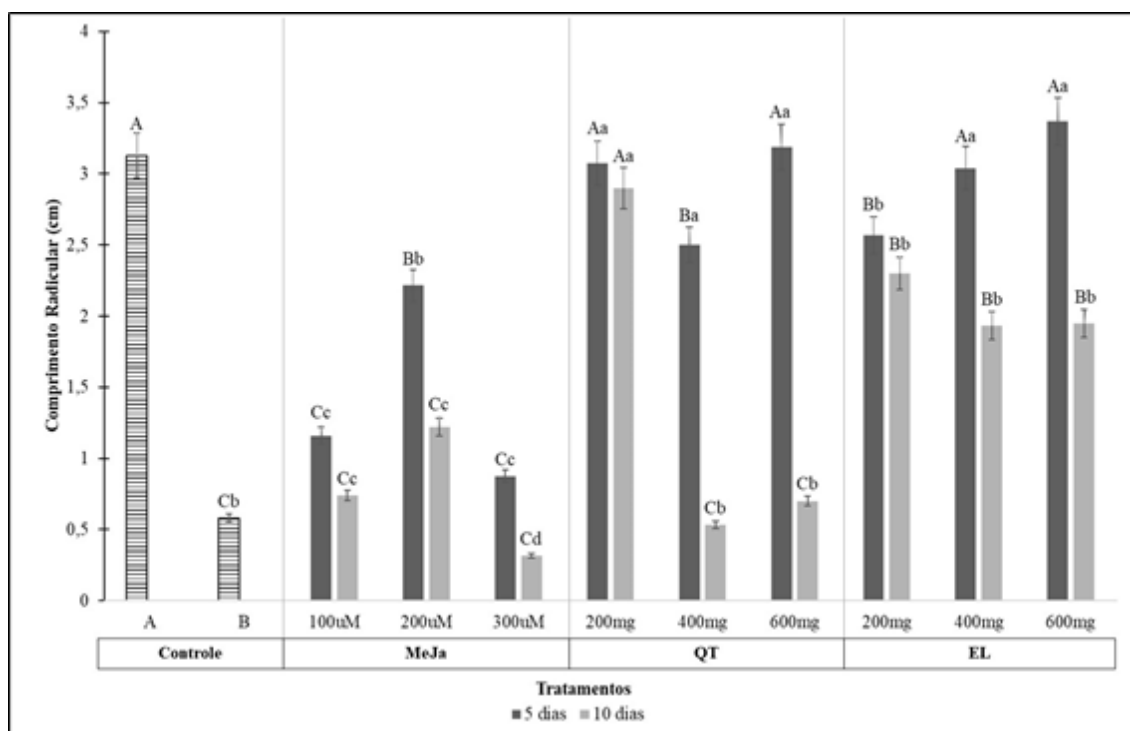


Figura 2 - Comprimento Radicular de plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético).

As letras maiúsculas comparam entre os elicitores e o tempo de elicitação e as letras minúsculas entre as concentrações do mesmo elicitor e o tempo de elicitação. As médias (n=3) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

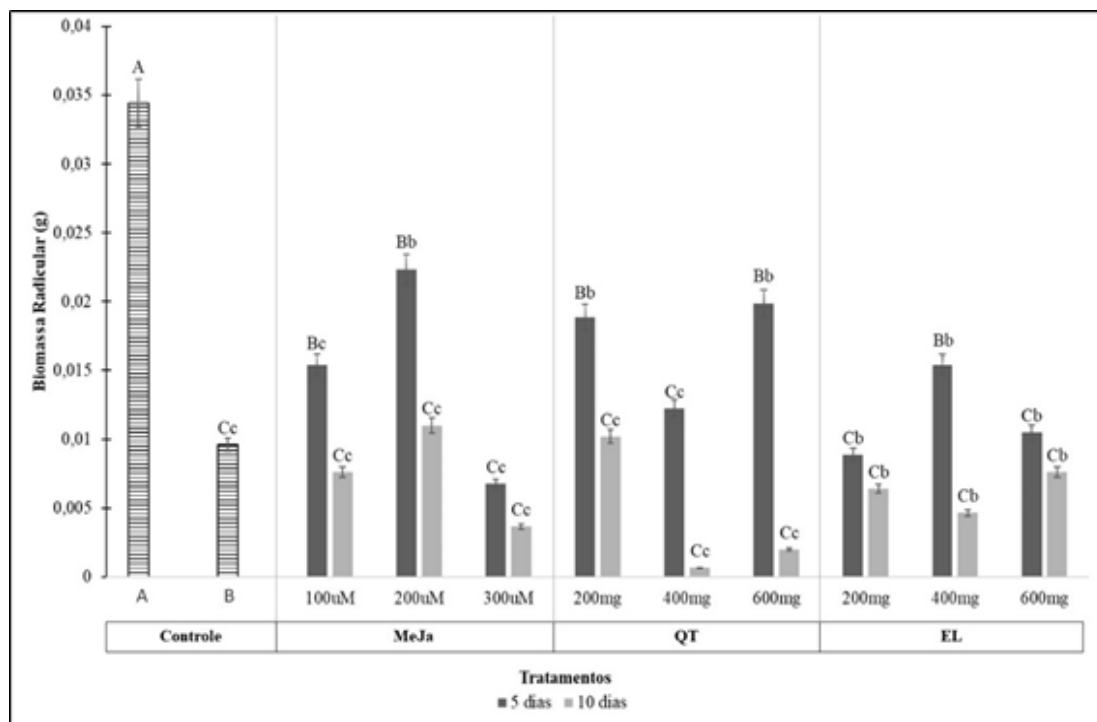


Figura 3 - Biomassa Radicular de plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético).

As letras maiúsculas indicam a comparação entre os tratamentos dos elicitores, e as letras minúsculas entre tratamentos do mesmo elicitor. As médias (n=3) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

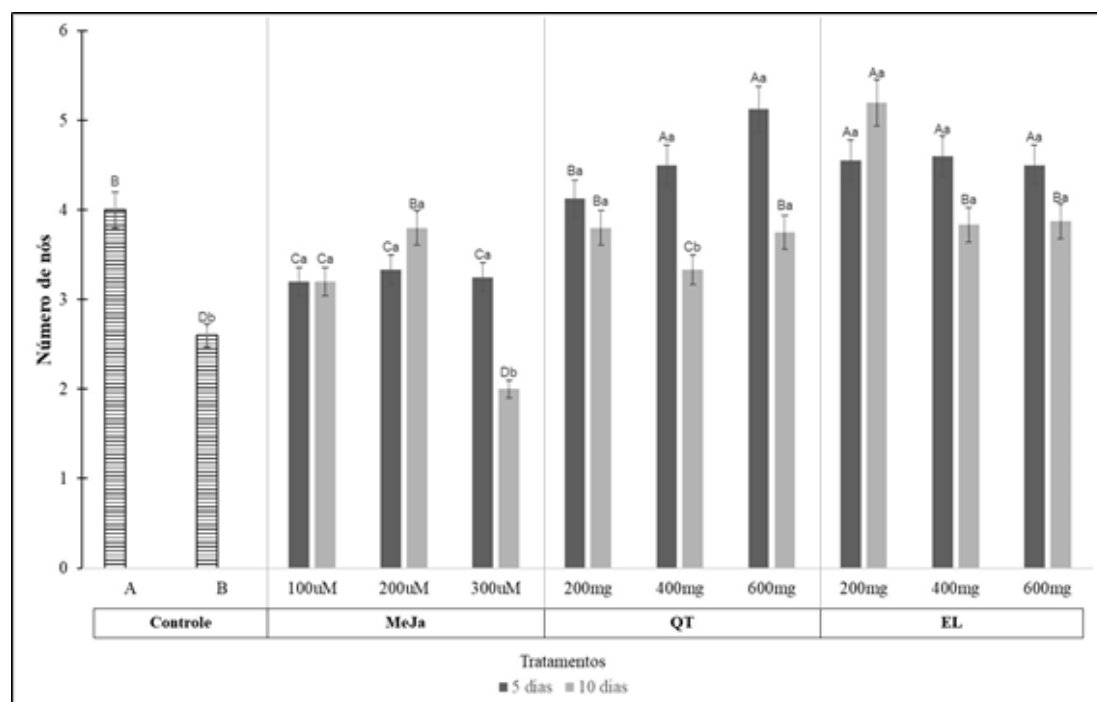


Figura 4 – Número de nós de plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético).

As letras maiúsculas comparam entre os elicitores e o tempo de elicitação e as letras minúsculas entre as concentrações do mesmo elicitor e o tempo de elicitação. As médias (n=3) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

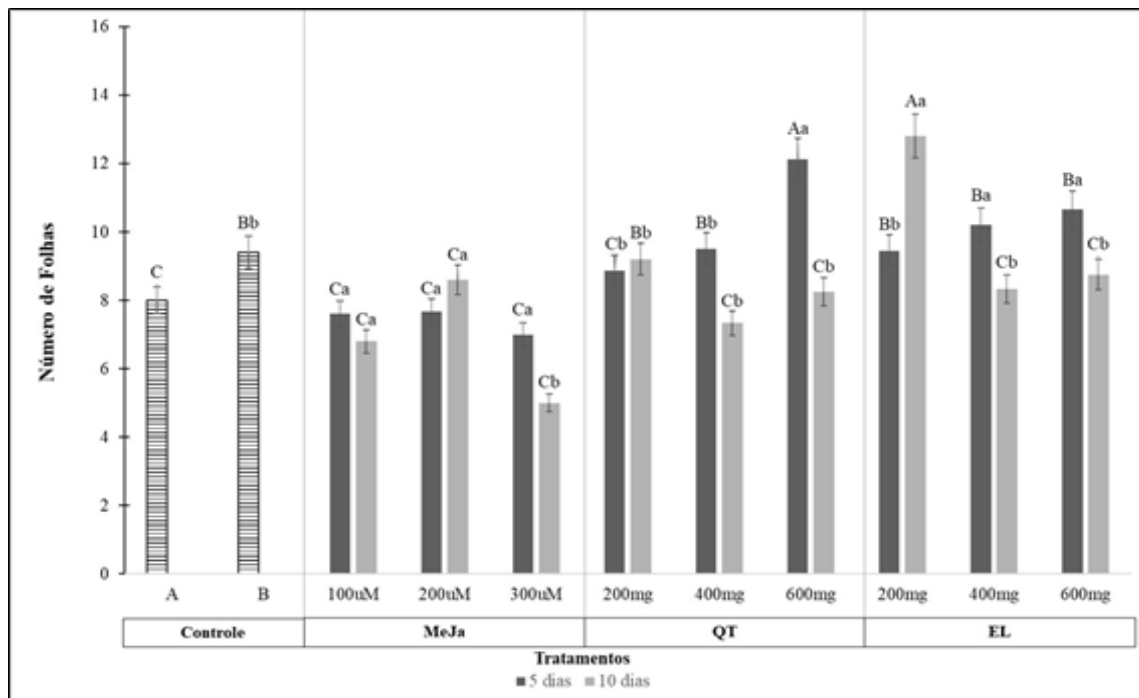


Figura 5 - Número de Folhas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). (Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores; Control B: meio nutritivo com a adição de ácido acético).

As letras maiúsculas comparam entre os elicitores e o tempo de elicitação e as letras minúsculas entre as concentrações do mesmo elicitor e o tempo de elicitação. As médias (n=3) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

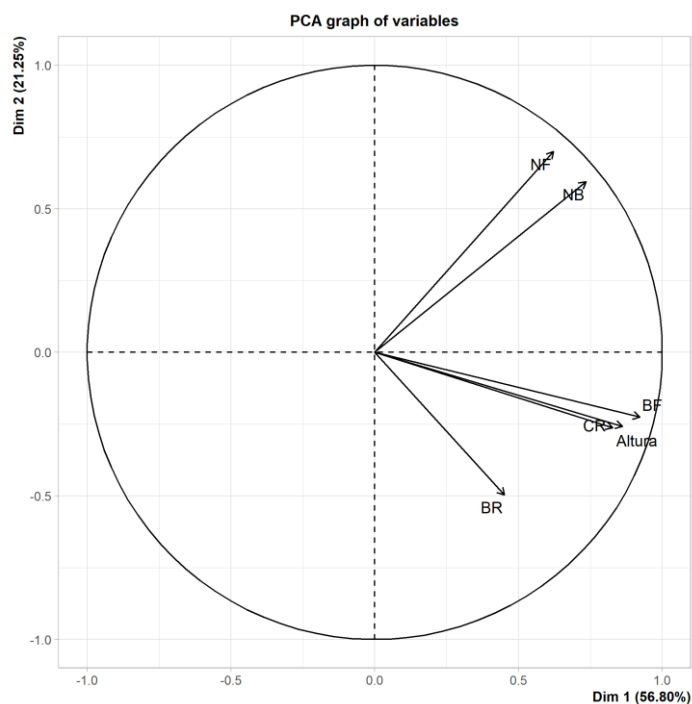


Figura 7 – Análise de Componentes Principais (ACP) de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). NF: Número de Folhas; NB: Número de Nós; BF: Biomassa Foliar; CR: Comprimento Radicular; BR: Biomassa Radicular.

Bioquímica

Diante da redução da biomassa das plantas elicidadas por 10 dias em todos os tratamentos, incluindo o controle B, não foi possível obter a quantidade de material vegetal necessária para a realização das análises bioquímicas.

Quanto às enzimas do estresse antioxidativo, observou-se que a SOD apresentou aumento de sua atividade nas plantas submetidas a $300 \mu\text{M L}^{-1}$ de MeJa e 400 mg L^{-1} de QT (Figura 8). Já a APX teve sua atividade aumentada em 194% nas plantas elicidadas com 400 mg L^{-1} de QT, em comparação ao controle A (Figura 9). A atividade da CAT foi maior nas plantas tratadas com $100 \mu\text{M L}^{-1}$ de MeJa e 200 mg L^{-1} de QT, quando comparados ao controle e demais tratamentos (Figura 10).

Observou-se que o teor de H_2O_2 foi maior nas plantas do tratamento controle em relação às plantas dos demais tratamentos (Figura 11). Em relação a peroxidação lipídica, os maiores teores de MDA foram encontrados nas plantas tratadas com $200 \mu\text{M L}^{-1}$ de MeJa e 200 mg L^{-1} de QT (Figura 12). Além disso, teor de proteínas solúveis totais foi maior nas plantas do tratamento controle A, mas também nas plantas que receberam $100 \mu\text{M L}^{-1}$ de MeJa, 400 mg L^{-1} de QT e 200 mg L^{-1} de EL, as quais apresentaram valores semelhantes ao controle A (Figura 13).

A Análise de Componentes Principais (ACP), mostrou que aproximadamente 61,56 % da variação encontrada pode ser explicada pelos parâmetros bioquímicos (Figura 14). De modo que o teor de Proteínas Solúveis Totais (PST) e a atividade da APX estão correlacionados positivamente, o que significa que os tratamentos com maior atividade de APX, tendem a apresentar um maior teor de PST. Assim como, pode-se observar que as demais variáveis estão negativamente correlacionadas com a APX e PST, principalmente os teores de MDA e H_2O_2 . Isso significa que quanto maior for a atividade da APX e o teor de PST, os teores de MDA e H_2O_2 tendem a serem menores.

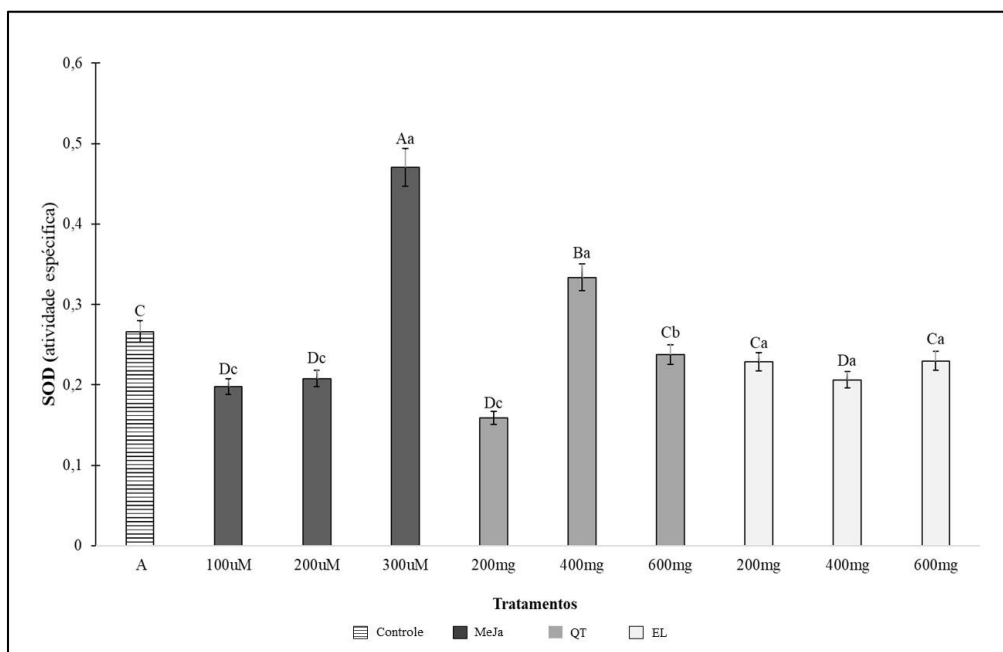


Figura 8 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) ($U\ SOD\ mg^{-1}\ proteína$) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores.

As letras maiúsculas indicam a comparação entre os tratamentos com elicitores e as letras minúsculas entre tratamentos do mesmo elicitor. As médias ($n=3$) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

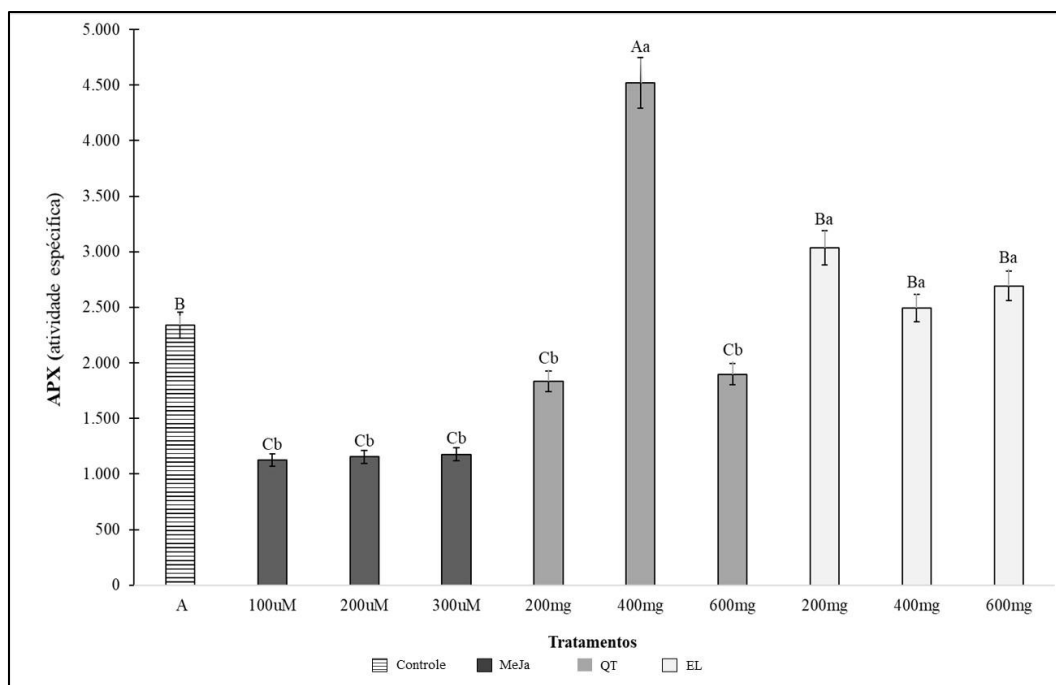


Figura 9 – Atividade da Ascorbato peroxidase (APX) ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores.

As letras maiúsculas indicam a comparação entre os tratamentos dos elicitores, e as letras minúsculas entre tratamentos do mesmo elicitor. As médias ($n=3$) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

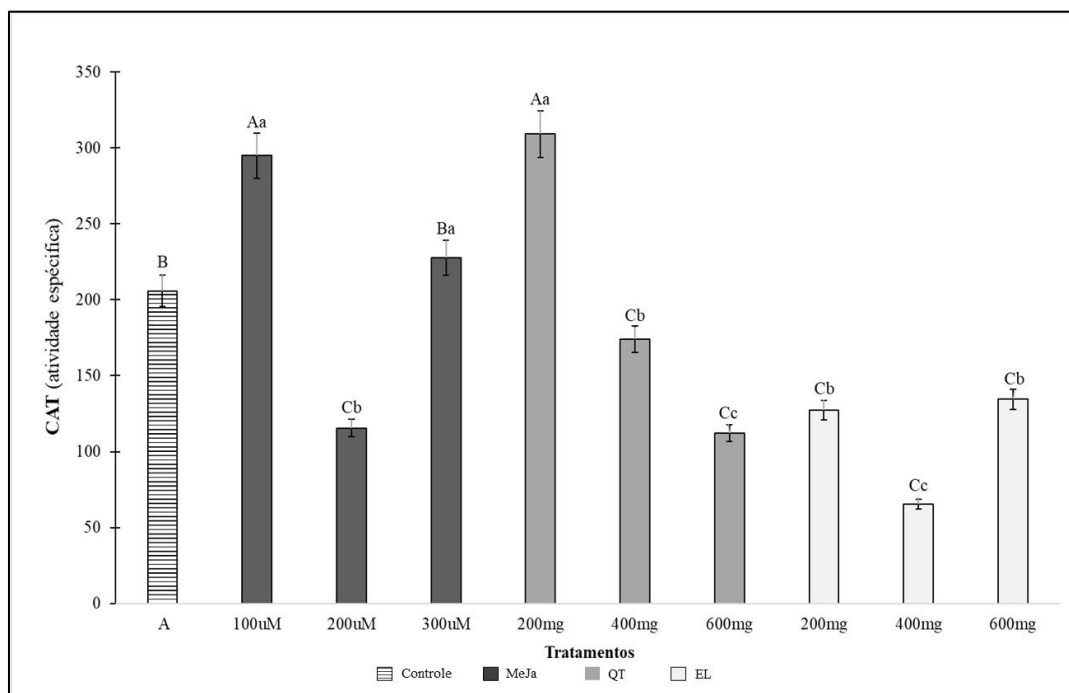


Figura 10 – Atividade da catalase (CAT) ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores.

As letras maiúsculas indicam a comparação entre os tratamentos dos elicitores, e as letras minúsculas entre tratamentos do mesmo elicitor. As médias (n=3) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

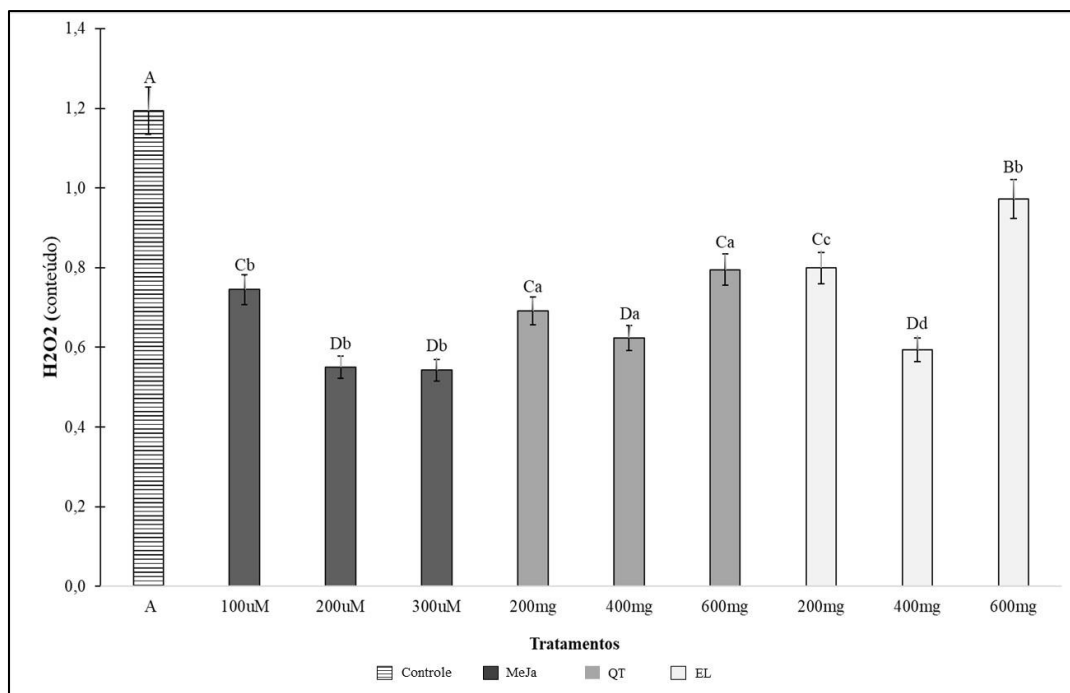


Figura 11 – Teor de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (μmol g⁻¹ de massa fresca) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores.

As letras maiúsculas indicam a comparação entre os tratamentos dos elicitores, e as letras minúsculas entre tratamentos do mesmo elicitor. As médias (n=3) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

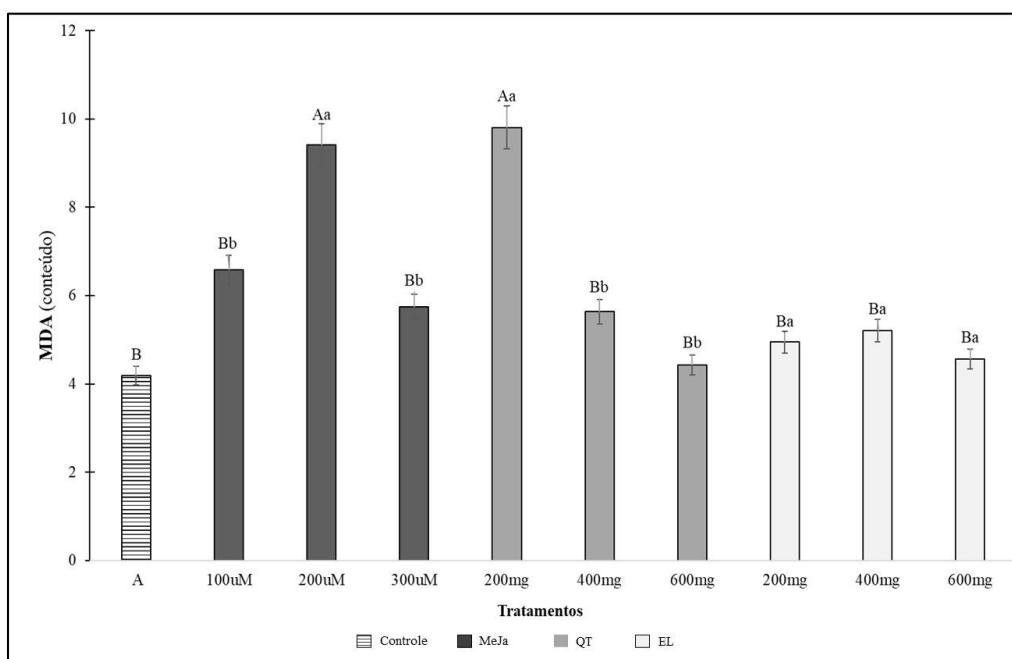


Figura 12 – Teor de Malondialdeído (MDA) (nmol g^{-1} de massa fresca) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias). Controle A: meio de nutritivo sem a adição de elicitores.

As letras maiúsculas indicam a comparação entre os tratamentos dos elicitores, e as letras minúsculas entre tratamentos do mesmo elicitor. As médias ($n=3$) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

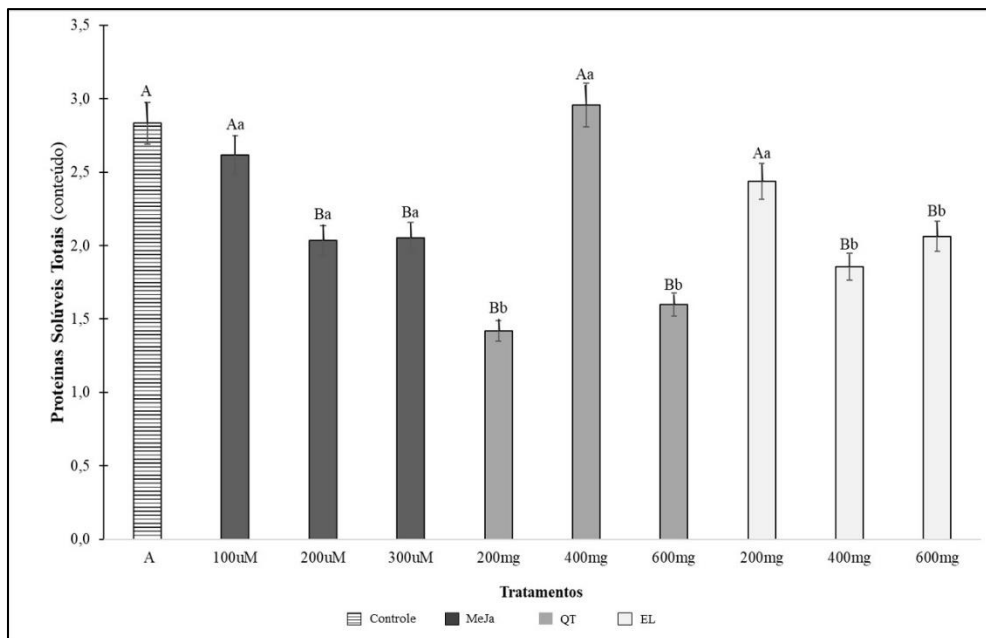


Figura 13 – Teor de Proteínas Solúveis Totais (mg/mL) em plantas de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias).

As letras maiúsculas indicam a comparação entre os tratamentos dos elicitores, e as letras minúsculas entre tratamentos do mesmo elicitor. As médias ($n=3$) foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

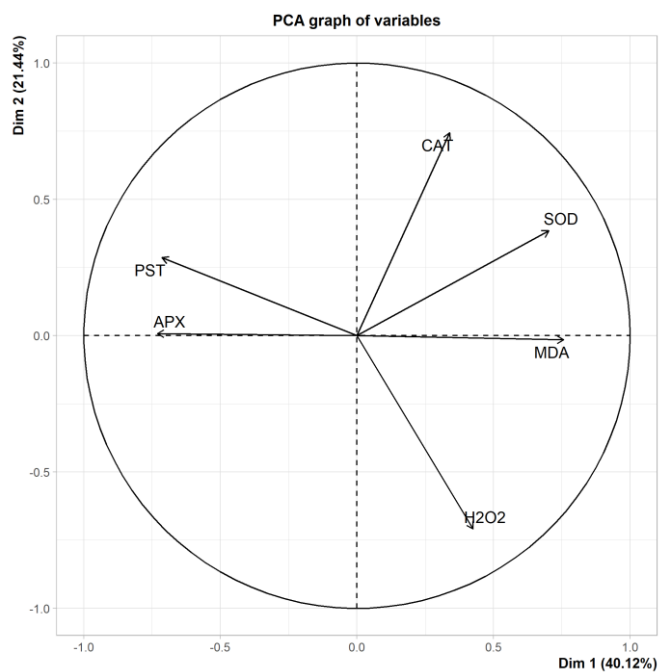


Figura 14 – Análise de Componentes Principais (ACP) de *Lippia alba* submetidas por 5 ou 10 dias a elicitores bióticos e avaliadas ao final do experimento (34 dias).

Composição do óleo essencial

Os elicitores bióticos – metil jasmonato, quitosana e extrato de levedura – promoveram alterações na composição dos óleos essenciais em *L. alba* (Tabela 1). Esses elicitores estimularam a produção de 26 compostos, entretanto a presença ou ausência de cada um deles, assim como a concentração, variou de acordo com o tipo de elicitor e o tempo de elicitação das plantas.

Os óleos essenciais das plantas apresentaram principalmente: methyl-1,4-cyclohexadiene, 5-methylene-2-norbornene, ethyl pent-4-enoate, exo-2-norboneol, p-cymene, limonene, geraniol e geranial. Desses compostos, apenas o geranial, methyl-1,4-cyclohexadiene e exo-2-norboneol estavam presentes nas plantas do tratamento controle (Tabela 1). Sendo, o limonene, geraniol e geranial, os compostos com a maior concentração.

Observamos que dependendo do elicitor, o composto que apresentava a maior concentração variava, de forma que o geranial foi o principal composto do óleo essencial das plantas controle e das elicidadas com MeJa, enquanto o limonene foi o principal componente do óleo essencial das plantas elicidadas com QT e EL.

As plantas submetidas a 200 mg L⁻¹ de QT por 5 dias apresentaram a maior concentração de methyl-1,4-cyclohexadiene (11,65%). Enquanto as tratadas com 200 mg L⁻¹ de QT por 10 dias apresentaram o maior teor de ethyl pent-4-enoate (1,73%). Já as plantas tratadas com 400mg L⁻¹ de EL por 10 dias tiveram o maior teor de 5-methylene-2-norbornene (5,87%). O maior teor de p-Cymene foi observado nas plantas elicidadas com 400mg L⁻¹ de EL por 5 dias (12,30%). As plantas tratadas com 400 mg L⁻¹ de QT por 5 dias apresentaram o maior teor de Limonene (44,79%). As maiores concentrações de geraniol (22,64%) e geranial (38,52%) foram verificadas nas plantas tratadas com 300 µM L⁻¹ de MeJa elicitados por 5 e 10 dias, respectivamente. As plantas do controle B apresentaram a maior concentração de exo-2-norboneol (7,54%).

Camphene	946			0,7	0,6				0,3	0,5	7,0	5,13	1,24	1,19	0,63	0,68	1,67	1,05				
				0	8				6	4	2											
Exo-2-Norbornoneol	970	1,23	7,54	4,4	4,2	3,2	3,7	3,7	4,1	3,6	3,86	5,56	5,77	4,25	4,43	5,35	5,69	4,00	4,88	4,45	3,78	
				4	3	2	7	8	1	5												
mesitylene	994			0,7	0,9				0,5	0,8				1,72	1,76	1,28	1,53			1,31	1,09	
				5	4				8	6												
α-terpinene	1014			0,3	0,7									0,70	0,54							
				6	0																	
p-Cymene	1020			6,9	4,0	7,2	7,3	4,5	4,8	6,7	6,66	10,3	10,0	7,14	6,19	7,66	8,79	12,3	10,1	8,77	7,67	
				7	3	0	2	5	0	5		4	7					0	1			
1-p-menthene	1021	7,29	5,85	0,1	0,7											1,28	1,40					
				3	9																	
o-Cymene	1022	5,77	4,26	0,4	0,6					0,8	0,98			0,51	0,44							
				4	7					2												
Limonene	1024			25,	22,	25,	26,	17,	17,	23,	22,3	44,7	43,5	34,2	32,3	28,5	30,1	39,4	38,3	38,2	40,8	
				95	13	94	43	02	39	64	6	9	9	9	2	4	3	6	7	1	7	

Santalone	1180			2,3	2,0	2,5	2,7	1,9	1,8		4,13	4,21	3,64	3,65	3,45	3,36		4,01	3,22	3,72	
				0	5	4	6	5	3												
Cis-sabinene hydrate acetate	1219							0,5	0,6										1,84	1,59	
								6	7												
Geraniol	1249		3,58	11,42	13,58	13,42	13,02	22,64	21,66	7,54	8,22	5,69	5,57	9,41	10,01	6,83	6,93	4,69	5,00	11,56	12,05
Geranial	1264	7,10	7,90	28,53	25,20	33,31	32,13	37,12	38,52	15,77	16,42	7,13	7,49	16,02	17,29	11,08	11,26	11,95	12,15	15,21	16,14
Trans-verbenyl acetate	1291	10,92	12,65	1,89	1,91					1,59	0,85										
Gerayl formate	1298			2,18	1,49	0,98	1,18	1,21	1,10	2,05	1,68	1,66	2,37	2,17	1,74	2,21	2,23	2,45	2,87		
Methyl geranate	1322	49,83	47,88		2,89					3,94	3,03				5,15	5,80					

δ-Elemente	1335			1,0	1,4					1,0	0,58	2,02	3,02	2,15	1,95	2,13	2,74	2,30	3,44	2,57	
				2	2					3											
β-elemente	1389													1,47		0,42	1,08				
Total		89,02	95,00	97,	91,	96,	96,	94,	96,	97,	90,6	93,4	96,3	97,2	93,6	89,0	94,9	87,6	94,9	98,8	97,9
				64	13	37	99	44	61	98	7	1	4	8	5	2	0	6	9	3	3

DISCUSSÃO

Os tratamentos submetidos a elicitação apresentaram redução da biomassa radicular, o que pode ter sido provocada pela ação direta do elicitor no sistema radicular ou na base das microestacas (local do surgimento das raízes adventícias), inibindo o desenvolvimento radicular. Isso sugere que a planta pode ter realizado uma realocação de recursos como estratégia de defesa contra um possível ataque por patógenos, dessa forma, esse mecanismo pode ser interpretado como uma tentativa da planta de privar o patógeno dos nutrientes necessários (SCHULTZ et al., 2013). Essa estratégia pode ter possibilitado o aumento do crescimento da parte aérea das plantas elicidadas com QT e EL, devido a realocação dos recursos.

O MeJa promoveu a redução da biomassa radicular e do comprimento da raiz. O efeito inibitório desse elicitor sobre a raiz foi observado anteriormente em culturas de soja (*Glycine max*) (GHASSEMI-GOLEZANI & FARHANGI-ABRIZ 2018) e centela (*Centella asiatica*) (VAN NGUYEN et al. 2019). Além disso, esse elicitor também afetou o crescimento e desenvolvimento das plantas. Isso pode ter acontecido, porque a síntese deste composto simula a defesa após-injúrias (RAMIREZ-ESTRADA et al. 2016). O que sugere que a planta ao absorver uma quantidade excessiva de metil jasmonato, teve o sistema de defesa ativado promovendo um aumento na produção de metabólitos secundários, e como consequência houve uma redução no crescimento, já que os jasmonatos são potenciais reguladores do crescimento vegetal (GHASEMI PIRBALOUTI & SAJJADI 2014).

A elicitação durante 10 dias afetou negativamente o crescimento e desenvolvimento de *L. alba*. Isso porque um dos fatores que influenciam no processo de elicitação é o tempo de exposição da planta ao elicitor, como foi observado em *Silybum marianum* (HASANLOO et al. 2008), *Gymnema sylvestre* (CHODISETTI et al. 2015) e *Castilleja tenuiflora* (RUBIO-RODRÍGUEZ et al. 2021).

De modo geral, observou-se uma interação inversamente proporcional entre a atividade da APX e os teores de MDA. Quando o sistema de defesa é ativado, a SOD começa a catalisar a conversão de O_2^- em H_2O_2 , e a CAT e a APX são responsáveis por removê-lo, entretanto, a APX tem maior especificidade e consegue eliminar o H_2O_2 antes mesmo que este alcance concentrações elevadas nas células vegetais, o que pode preceder a uma condição de estresse oxidativo nas plantas (MONDAL et al. 2004). Assim, o H_2O_2 pode ser reduzido e removido

pela APX através do ascorbato como redutor, formando o radical monodehidroascorbato (RESENDE et al. 2003).

Nas plantas tratadas com 200mg L⁻¹ de QT, percebe-se que a resposta do sistema antioxidativo não foi eficiente, pois houve um aumento no teor de MDA. Já nas plantas submetidas a 400 e 600 mg L⁻¹, observamos o inverso, pois a adição de QT reduziu o dano à membrana celular, já que houve uma redução nos níveis de MDA nesses tratamentos. Isso sugere, que a QT estimulou os mecanismos de defesa da planta, atuando na produção aumentada de enzimas antioxidantes, como a SOD, APX, CAT e no ciclo ascorbato-glutationa, minimizando os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (ERO) (HIDANGMAYUM et al. 2019; KHAN et al. 2019; ZENG et al. 2010).

A QT afeta as vias de transdução de sinal da planta, pois esse composto mimetiza a patogenicidade fúngica de ocorrência natural (IRITI & FAORO 2009; KHAN et al. 2019), o que possibilita a ativação desses mecanismos de defesa. Além da produção aumentada de enzimas antioxidantes, a QT atua na síntese de metabolitos secundários, como compostos fenólicos e flavonoides (HIDANGMAYUM et al. 2019; KHAN et al. 2019; ZENG et al. 2010). Como pode ser observado nas plantas elicitadas com 200 e 400mg L⁻¹ de QT, que apresentaram as maiores concentrações de methyl-1,4-cyclohexadiene e limoneno, respectivamente.

Os elicitores promoveram alterações no perfil de composição dos óleos essenciais de *L. alba*, possibilitando o aumento de p-cymene, limonene, geraniol e geranial, que foram estimulados por todos os elicitores e concentrações avaliadas. Esses compostos são monoterpenos que apresentam atividades antioxidante, antinociceptiva, antiinflamatória, ansiolítica, anticâncer, antifúngica, antibacteriana, antidiabético, cardioprotetor e inseticida (MARCHESE et al. 2017; HAN et al. 2020; LIRA et al. 2020).

O óleo essencial de *L. alba* apresenta uma composição variável devido à sua plasticidade morfofisiológica em relação às condições ambientais, o que proporciona a existência de vários quimiotipos (HENNEBELLE et al. 2008a; BLANK et al. 2015; TREVISAN et al. 2016). A composição química do óleo essencial pode ser influenciada por fatores edafoclimáticos, fatores genéticos e estágio de desenvolvimento da planta (GOBBO-NETO & LOPES 2007; VASCONSUELO & BOLAND 2007; GOUVEA et al. 2012). Como foi observado anteriormente por Castro et al. (2019, 2020), o cultivo de *L. alba in vitro* sob condições adversas como fotoperíodo de 24 horas ou submetidas a 60mM de NaCl, proporcionou aumento da concentração de linalol. Diferente de Castro et al. (2019, 2020), observamos que a elicitação não só aumenta a concentração de compostos, mas também

estimula a síntese de novos compostos em *L. alba*, o que proporciona a existência de diferentes quimiotipos.

Diante desses resultados, pode-se concluir que a aplicação exógena de elicitores como a quitosana, o extrato de levedura e o metil jasmonato, promovem modulações no crescimento, no sistema antioxidativo e no aumento da produção de metabólitos secundários em *L. alba*. Sendo que a elicitação nas plantas com 400 e 600 mg L⁻¹ de quitosana proporcionou melhores estratégias para a produção de metabólitos secundários de *Lippia alba* cultivada *in vitro*.

Conclusão

No presente estudo, verificamos que a elicitação de *Lippia alba* com quitosana *in vitro* é uma alternativa promissora para induzir o aumento da produção de metabolitos secundários de interesse farmacológico e cosmético. Esse resultado foi obtido principalmente quando as plantas foram elicitadas com 400 e 600 mg L⁻¹ de quitosana por 5 dias.

REFERÊNCIAS

- Adams RP. 2017. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4.1th ed. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, 809p.
- Ahmad, Z., Shahzad, A., Sharma, S., 2019. Chitosan versus yeast extract driven elicitation for enhanced production of fragrant compound 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (2H4MB) in root tuber derived callus of *Decalepis salicifolia* (Bedd. ex Hook. f.) Venter. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 136(1), 29-40. 19). <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1488-4>.
- Azevedo, R. A. D., Alas, R. M., Smith, R. J., Lea, P. J., 1998. 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, 104(2), 280-292. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.x>.
- Blank, A. F., Camêlo, L. C. A., Arrigoni-Blank, M. D. F., Pinheiro, J. B., Andrade, T. M., Niculau, E. D. S., Alves, P. B., 2015. Chemical diversity in *Lippia alba* (Mill.) NE Brown germplasm. The Scientific World Journal, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/321924>.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.

- Castro, K. M., Batista, D. S., Fortini, E. A., Silva, T. D., Felipe, S. H. S., Fernandes, A. M., Otoni, W. C., 2019. Photoperiod modulates growth, morphoanatomy, and linalool content in *Lippia alba* L.(Verbenaceae) cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *139*(1), 139-153. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01672-w>.
- Castro, K. M., Batista, D. S., Silva, T. D., Fortini, E. A., Felipe, S. H. S., Fernandes, A. M., Otoni, W. C., 2020. Salinity modulates growth, morphology, and essential oil profile in *Lippia alba* L.(Verbenaceae) grown in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *140*(3), 593-603. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01755-8>.
- Chodisetti, B., Rao, K., Gandi, S., Giri, A., 2015. Gymnemic acid enhancement in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* by using the signaling molecules—methyl jasmonate and salicylic acid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *51*(1), 88-92. DOI 10.1007/s11627-014-9655-8.
- Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C., & Ferreira, I. C., 2016. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial crops and products*, *82*, 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016>.
- Ghassemi-Golezani, K., Farhangi-Abriz, S., 2018. Foliar sprays of salicylic acid and jasmonic acid stimulate H⁺-ATPase activity of tonoplast, nutrient uptake and salt tolerance of soybean. *Ecotoxicology and environmental safety*, *166*, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.059>.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Sajjadi, S. E., Parang, K., 2014. A review (research and patents) on jasmonic acid and its derivatives. *Archiv der Pharmazie*, *347*(4), 229-239. <https://doi.org/10.1002/ardp.201300287>.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, *30*(2), 374-381.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K., 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, *59*(2), 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.
- Gouvea, D. R., Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P., 2012. The influence of biotic and abiotic factors on the production of secondary metabolites in medicinal plants. *Plant bioactives and drug discovery: principles, practice, and perspectives*, *17*, 419.
- Han, Y., Sun, Z., Chen, W., 2020. Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, *25*(1), 33. <https://doi.org/10.3390/molecules25010033>.
- Hasanloo, T., Rahnema, H., Sepehrifar, R., Shams, M. R., 2008. The Influence of yeast extract on the production of flavonolignans in hairy root cultures of *Silybum marianum* L. Gaertn.

In 4th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering 2008 (pp. 358-361). Springer, Berlin, Heidelberg.

Havir, E. A., McHale, N. A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84(2), 450-455. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>.

Heath, R. L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Dermont, C., Joseph, H., & Bailleul, F. 2006. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. *Chemistry & biodiversity*, 3(10), 1116-1125.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., Bailleul, F., 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of ethnopharmacology*, 116(2), 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.044>.

Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., Hemantaranjan, A., 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and molecular biology of plants*, 25(2), 313-326. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0633-1>.

Iriti, M., Faoro, F., 2009. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant signaling & behavior*, 4(1), 66-68. <https://doi.org/10.4161/psb.4.1.7408>.

Joshi, A., Prakash, O., Pant, A. K., Kumar, R., Negi, M. S., 2018. Chemical Analysis and Antioxidant Activity of Essential Oils of Two Morphotypes of *Lippia alba* (Mill.) NE Br. ex Britton & P. Wilson (Verbenaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(3), 687-700. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1486232>.

Julião, L. S., Tavares, E. S., Lage, C. L. S., Leitão, S. G., 2003. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) NE Br.(erva-cidreira). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 36-38. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300014>.

Khan, T., Khan, T., Hano, C., Abbasi, B. H., 2019. Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products*, 129, 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.048>.

Lira, M. H. P. D., Andrade Júnior, F. P. D., Moraes, G. F. Q., Macena, G. D. S., Pereira, F. D. O., Lima, I. O., 2020. Antimicrobial activity of geraniol: An integrative review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(3), 187-197. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1745697>.

- Machado, T. F., Nogueira, N. A. P., Pereira, R. D. C. A., Sousa, C. T. D., Batista, V. V., 2014. The antimicrobial efficacy of *Lippia alba* essential oil and its interaction with food ingredients. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 699-705. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200045>.
- Marchese, A., Arciola, C. R., Barbieri, R., Silva, A. S., Nabavi, S. F., Tsetegho Sokeng, A. J., Izadi, M., Jafari, N. J., Suntar, I., Dagila, M., Nabavi, S. M., 2017. Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene. *Materials*, 10(8), 947. <https://doi.org/10.3390/ma10080947>.
- Mendiburu, F., 2017. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*.
- Mendoza, D., Cuaspu, O., Arias, J. P., Ruiz, O., Arias, M., 2018. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology reports*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00273>.
- Mondal, K., Sharma, N. S., Malhotra, S. P., Dhawan, K., Singh, R., 2004. Antioxidant systems in ripening tomato fruits. *Biologia Plantarum*, 48(1), 49-53.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.
- Novaes Simões, L., Carine Campos Medeiros, L., Maria Heinzmann, B., Lucia Loro, V., de Carvalho Gomes, L., Thomas da Silva, D., Schmidt, D., Baldisserotto, B., 2017. Essential oil of *Lippia alba* as a sedative and anesthetic for the sea urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 50(3), 205-217. <https://doi.org/10.1080/10236244.2017.1362317>.
- Orlita, A., Sidwa-Gorycka, M., Paszkiewicz, M., Malinski, E., Kumirska, J., Siedlecka, E. M., Łojkowska, E., Stepnowski, P., 2008. Application of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and furoquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L.(common rue). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 51(2), 91-96. <https://doi.org/10.1042/BA20070200>.
- Patel, H., Krishnamurthy, R., 2013. Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2), 60-65.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., Palazon, J., 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), 182. <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>.
- Razavizadeh, R., Adabavazeh, F., Komatsu, S., 2020. Chitosan effects on the elevation of essential oils and antioxidant activity of *Carum copticum* L. seedlings and callus cultures under

- in vitro salt stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29(3), 473-483. <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00560-1>
- Resende, M. L. V., Salgado, S. M., Chaves, Z. M., 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, 28(2), 123-130. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000200001>.
- Roat, C., Ramawat, K. G., 2009. Elicitor-induced accumulation of stilbenes in cell suspension cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin. *Plant Biotechnology Reports*, 3(2), 135-138. DOI 10.1007/s11816-009-0082-y.
- Rubio-Rodríguez, E., Vera-Reyes, I., Sepúlveda-García, E. B., Ramos-Valdivia, A. C., Trejo-Tapia, G., 2021. Secondary metabolite production and related biosynthetic genes expression in response to methyl jasmonate in *Castilleja tenuiflora* Benth. in vitro plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01975-3>.
- Salimena, F. R. G., & Múlgura, M. E. 2015. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. *Rodriguésia*, 66(1), 191-197.
- Siqueira-Lima, P. S., Passos, F. R., Lucchese, A. M., Menezes, I. R., Coutinho, H. D., Lima, A. A., Zengin, G., Quintans, J. S. S., Quintans-Júnior, L. J., 2019. Central nervous system and analgesic profiles of *Lippia* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(1), 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.006>.
- Schultz, J. C., Appel, H. M., Ferrieri, A., & Arnold, T. M. 2013. Flexible resource allocation during plant defense responses. *Frontiers in plant science*, 4, 324.
- Tomazoni, E. Z., Pansera, M. R., Pauletti, G. F., Moura, S., Ribeiro, R. T., Schwambach, J., 2016. In vitro antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils Against *Alternaria solani* (Pleosporaceae) isolates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(2), 999-1010. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150019>.
- Trevisan, M. T., Marques, R. A., Silva, M. G., Scherer, D., Haubner, R., Ulrich, C. M., Owen, R. W., 2016. Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: identification, quantitation and antioxidant capacity. *Records of Natural Products*, 10(4), 485.
- Van Den Dool H, Kratz PD., 1963. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J Chromatogr A*. 11:463-471.
- Van Nguyen, K., Pongkitwitoon, B., Pathomwichaiwat, T., Viboonjun, U., Prathanturug, S., 2019. Effects of methyl jasmonate on the growth and triterpenoid production of diploid and tetraploid *Centella asiatica* (L.) Urb. hairy root cultures. *Scientific reports*, 9(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54460-z>

Vasconsuelo, A., Boland, R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant science*, 172(5), 861-875. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.01.006>.

Wang, J., Qian, J., Yao, L., Lu, Y., 2015. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 1-9. DOI 10.1186/s40643-014-0033-5.

Zeng, K., Deng, Y., Ming, J., Deng, L., 2010. Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by chitosan. *Scientia horticulturae*, 126(2), 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.017>.