



**UFRPE**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MARIA EDUARDA MAGALHÃES DE PAULA

**Efeitos da elicitação isolada e combinada de Ácido Salicílico e Metil Jasmonato  
nos parâmetros biométricos e bioquímicos em *Lippia alba* (Verbenaceae)**

**RECIFE - PE**

**2024**

MARIA EDUARDA MAGALHÃES DE PAULA

**Efeitos da elicitação isolada e combinada de Ácido Salicílico e Metil Jasmonato nos parâmetros biométricos e bioquímicos em *Lippia alba* (Verbenaceae)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcus Vinícius Loss Sperandio

**RECIFE - PE**

**2024**

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)

---

- D278e De Paula, Maria Eduarda Magalhães  
Efeitos da elicitação isolada e combinada de Ácido Salicílico e Metil Jasmonato nos parâmetros biométricos e bioquímicos em *Lippia alba* (Verbenaceae) / Maria Eduarda Magalhães De Paula. - 2024.  
46 f. : il.
- Orientador: Marcus Vinicius Loss Sperandio.  
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Recife, 2024.
1. Óleo Essencial. 2. Planta medicinal. 3. Elicitores. 4. Respostas bioquímicas. I. Sperandio, Marcus Vinicius Loss, orient. II. Título

CDD

---

MARIA EDUARDA MAGALHÃES DE PAULA

**Efeitos da elicitación isolada e combinada de Ácido Salicílico e Metil Jasmonato nos parâmetros biométricos e bioquímicos em *Lippia alba* (Verbenaceae)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Data da apresentação: 27 de Setembro de 2024.

Resultado:

**Banca Examinadora**

Orientador: \_\_\_\_\_

Marcus Vinícius Loss Sperandio (Orientador) - Doutor

Examinadora: \_\_\_\_\_

Jessie Marinho de Oliveira (Membro interno) - Mestre

Examinador: \_\_\_\_\_

Rodrigo José da Silva (Membro externo) - Mestre

RECIFE - PE

2024

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, à UFRPE e a tudo que a universidade me proporcionou nos quase cinco anos de graduação. A Rural foi um segundo lar, com professores que marcaram minha vida para sempre, e experiências, oportunidades e ensinamentos que também não serão facilmente esquecidos. Além do acadêmico, a Rural ainda me apresentou a um grupo de pessoas incríveis que foram uma das maiores fontes de sanidade e carinho durante todo o curso. Obrigada, Grupomano! Vocês foram e são muito importantes. Para Afonso especialmente, outro presente da rural: Obrigada por ter sido minha dupla oficial dentro e fora da sala de aula.

Em segundo lugar, mas não menos importante, agradeço ao LFP e a todos os seus integrantes, em especial ao professor Marcus, pela orientação, confiança, acolhimento e tranquilidade transmitida em cada uma das reuniões; à Jessie, que foi companheira de tantos dias intensos de laboratório; à Nanny, que foi um socorro nos momentos de dúvidas; e à Marina e Bruna, pela amizade e ajuda no dia a dia. Sempre gostei da botânica, e o LFP só contribuiu para cimentar este gosto.

Não posso deixar de agradecer a outras pessoas externas à Rural, mas igualmente envolvidas. Agradeço à minha família, que sempre apoiou meus estudos e acredita tanto em mim, que às vezes é mais do que eu mesma acredito. Sem o estímulo e o exemplo delas, talvez eu não estivesse aqui hoje. A Caio e a Shanti, obrigada por estarem comigo sempre dando apoio e tantas outras coisas mais. Vocês me fazem mais forte, mais feliz e muito mais sã. A Gabi, Giu e Juliana, irmãs de uma forma ou de outra, obrigada pelo suporte e pelos ombros para desabafos quando as coisas estavam um pouco demais. Que rede de apoio. Por último, agradeço a mim mesma, pela perseverança de chegar até aqui. Foi uma linda jornada.

“O feijão germina no algodão, a vida  
sempre vence.”

(Emicida)

## RESUMO

A *Lippia alba*, principalmente associada à Caatinga e ao Cerrado, é uma planta arbustiva aromática da família Verbenaceae, sendo utilizada na medicina tradicional por suas propriedades farmacológicas atribuídas ao óleo essencial produzido das folhas. Uma das ferramentas utilizadas para aumentar a produtividade *in vitro* e *in vivo* de compostos bioativos é a elicitação. Este trabalho visa analisar os efeitos da aplicação individual e combinada dos elicitores Metil Jasmonato e Ácido Salicílico em *L. alba* após um curto período de elicitação, por meio de parâmetros bioquímicos e biométricos. Estacas de *L. alba* foram cultivadas em hidroponia e transplantadas para casa de vegetação. Os tratamentos individuais e o combinado receberam a concentração de 4 mM Ácido Salicílico e 2 mM Metil Jasmonato. Foi estabelecido um tratamento adicional com a aplicação de etanol 1%, usado para a diluição do Ácido Salicílico. A coleta do experimento ocorreu uma semana após a elicitação. Os grupos experimentais elicitados apresentaram diferenças significativas em relação ao controle no rendimento do óleo, nas análises oxidativas e de atividade enzimática realizadas, mas mantiveram um padrão nos parâmetros associados ao crescimento, carboidratos e proteínas. O perfil bioquímico do tratamento combinado diferiu dos demais. A elicitação *in vivo* combinada com Ácido Salicílico e Metil Jasmonato aumentou o rendimento do óleo essencial de *L. alba* sem afetar a produção de biomassa, sugerindo uma modulação eficaz do metabolismo da planta. Portanto, a elicitação nas concentrações avaliadas se mostra uma ferramenta viável para otimizar a produção de compostos de interesse nesta espécie após curto período de elicitação.

**Palavras-chave:** Óleo Essencial, Planta medicinal, Elicitores, Respostas bioquímicas.

## ABSTRACT

*Lippia alba* is an aromatic shrub from the Verbenaceae family, primarily associated with Brazil's Caatinga and Cerrado regions. It is used in traditional medicine for its pharmacological properties, those being attributed to the essential oil the plant produces as a defense mechanism. A tool that can be used to increase the productivity of bioactive compounds in both *in vitro* and *in vivo* development is elicitation. This study aims to analyze the effects of isolated and combined applications of the elicitors Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on *L. alba*, using biochemical and biometric data as parameters one week after the elicitation. Cuttings of *L. alba* were maintained in hydroponic cultivation and later transferred to a greenhouse. The combined and isolated treatments received a concentration of 4 mM Salicylic Acid and 2 mM Methyl Jasmonate. An additional group was established, receiving an application of 1% ethanol. The experiment was harvested one week after the elicitation. Elicited treatments showed significant differences in essential oil yield, oxidative stress analysis, and enzymatic activity compared to the control. Growth parameters, along with carbohydrate and protein levels, kept similar patterns in all treatments. *In vivo*, combined Salicylic Acid and Methyl Jasmonate elicitation increased essential oil yield on *L. alba* without affecting biomass production, suggesting an efficient modulation of the plant metabolism. Therefore, elicitation at the tested concentrations demonstrated to be a viable tool to optimize the production of bioactive compounds in this species in a short elicitation period.

**Keywords:** Essential oil, Medicinal plant, Elicitors, Biochemical responses

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Morfologia da espécie *Lippia alba*, da família Verbenaceae; a. Botão floral e flor seca; b. Inflorescência; c. Superfície adaxial da lâmina foliar; d. Superfície abaxial da lâmina foliar; e. Terminação de um ramo, evidenciando a filotaxia e inflorescências. Fonte: Autoria própria.....**16**

**Figura 2.** Parâmetros do crescimento obtidos em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM). (A) Número de folhas; (B) Massa fresca das folhas. (C) Altura da parte aérea; (D) Massa seca de raiz; (E) Diâmetro do caule; (F) Massa fresca do caule. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.....**28**

**Figura 3.** Concentração de Pigmentos Fotossintéticos obtidos em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM). (A) Clorofila a; (B) Clorofila b; (C) Clorofila total; (D) Carotenoides. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.....**29**

**Figura 4.** Marcadores oxidativos teor de malondialdeído (MDA) (A) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (B) em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2mM). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.....**30**

**Figura 5.** Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) (A), Ascorbato peroxidase (APX) (B) e Catalase (CAT) (C) em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM); Letras diferentes indicam

diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.....31

**Figura 6.** Teor de Prolina (A), Carboidratos solúveis totais (B) e quantificação das proteínas totais solúveis (C) em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.....32

**Figura 7.** Rendimento do Óleo Essencial em porcentagem em relação a massa seca vegetal em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.....33

**Figura 8.** Análise de Cluster Hierárquica; T1= Controle; T2= Etanol 1%; T3= Ácido Salicílico (AS 4 mM); T4= Metil Jasmonato (MeJa 2 mM); T5= Elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM); NF = Número de folhas; Altura = Comprimento da parte aérea; DC = Diâmetro do caule; MF\_Folha = Massa fresca das folhas; MF\_raiz = Massa fresca da raiz; MF\_caule = massa fresca do caule; Ca = Clorofila a; Cb = Clorofila b; Ct = Clorofila total; Car = Carotenoides; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Concentração de peróxido; MDA = Malondialdeído; OE = Rendimento do Óleo Essencial; SOD = Atividade da superóxido dismutase; APX = Atividade da ascorbato peroxidase; CAT = Atividade da catalase; Pro = Concentração de prolina; CST = Carboidratos solúveis totais; Ptn = Proteínas solúveis totais.....34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultados de ANOVA.....	<b>26</b>
---	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APX – Ascorbato peroxidase

AS – Ácido Salicílico

CAT – Catalase

DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado

ERO – Espécie reativa de oxigênio

HCA – Análise de cluster hierárquico (do inglês, “Hierarchical Cluster Analysis”)

JA – Jasmonatos

MAP – Proteíno-quinases ativadas por mitógenos (do inglês, “Mitogen Activated Protein Kinases”)

MDA – Malondialdeído

MeJa – Metil Jasmonato

MEP – Fosfato de metileritritol (do inglês, “Methylerythritol phosphate”)

MF – Massa fresca

MVA – Ácido mevalônico (do inglês, “mevalonic acid”)

OE – Óleo Essencial

PANC – Plantas Alimentícias Não Convencionais

PPDF – Densidade de Fluxo de Fótons Fotossintéticos (do inglês, “Photosynthetic Photon Flux Density”)

RSA – Resistência sistêmica adquirida

SNK – Student-Newman-Keuls

SOD – Superóxido Dismutase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
2.1. Lippia alba.....	15
2.2. Óleo Essencial.....	16
2.3. Elicitores.....	18
2.4. Ácido Salicílico (AS).....	19
2.5. Metil Jasmonato (MeJa).....	20
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
3.1. Objetivos gerais.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Material vegetal e condições de crescimento.....</b>	<b>22</b>
4.1.1. Parâmetros Analisados.....	23
4.1.2. Avaliações de crescimento.....	23
<b>4.2. Análises bioquímicas.....</b>	<b>24</b>
4.2.1. Pigmentos fotossintéticos.....	24
4.2.2. Atividade enzimática.....	24
4.2.3. Solutos solúveis e Marcadores Oxidativos.....	24
<b>4.3. Análise do Óleo Essencial.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4. Análise estatística.....</b>	<b>25</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1. Parâmetros de Crescimento.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2. Pigmentos Fotossintéticos.....</b>	<b>28</b>
<b>5.3. Análise oxidativa.....</b>	<b>29</b>
<b>5.4. Análise bioquímica dos metabólitos.....</b>	<b>31</b>
<b>5.5. Óleo essencial.....</b>	<b>33</b>
<b>5.6. Análise multivariada.....</b>	<b>33</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Uma planta medicinal, seguindo a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é uma “espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos;”. *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson, ou erva-cidreira pelo nome comum, um arbusto aromático da família Verbenaceae, se enquadra nessa categoria por apresentar diversas atividades farmacológicas comprovadas (Heinzmann e Barros, 2007). Além da propriedade analgésica, bem conhecida (Costa *et al.*, 1989), a *L. alba* também está relacionada a efeitos calmantes, antimicrobianos, antiespasmódicos, mucolíticos e até mesmo sedativos (Lorenzi e Matos, 2002; Aguiar *et al.*, 2002), com já duas patentes registradas no Brasil em 2011 para extratos da planta com funções anestésica e antimicrobiana (Camillo, 2017). É utilizada historicamente pela medicina popular para tratar doenças e sintomas amplos, pelos efeitos supracitados. Em indústrias químico-agrícolas, destaca-se pela ação antifúngica e repelente. Além disso, apresenta relevância na indústria cosmética devido à sua característica aromática (Camêlo *et al.*, 2011), entre outras aplicações.

As propriedades medicinais da erva cidreira são atribuídas a metabólitos secundários como flavonoides, taninos, iridoides, resinas, mucilagens e óleos essenciais (OEs) produzidos pela planta, sendo este último formado por substâncias como os monoterpenos e os sesquiterpenos (Heinzmann e Barros, 2007). A *L. alba* possui um grande potencial econômico devido aos diversos princípios ativos presentes em seu óleo essencial. Variações na composição deste OE ocorrem de acordo com o quimiotipo da *L. alba* e possíveis estresses sofridos, que alteram o metabolismo secundário da planta para se adaptar às adversidades que o ambiente proporciona (Lorenzi e Matos, 2002; Gupta, Sharma e Saxena, 2016). Agentes causadores de estresse podem ser bióticos, como no caso de herbivoria e patógenos, ou abióticos, como salinidade, temperatura e seca (Gupta, Sharma e Saxena, 2016). Quando aplicados em células vivas com o objetivo de induzir ou aumentar a biossíntese de algum composto, esses agentes são chamados de elicitores, e o processo de aplicação é denominado elicitação (Namdeo, 2007). O ácido salicílico (AS) e o Metil Jasmonato (Meja) são elicitores endógenos e abióticos, que funcionam como moléculas de sinalização intracelular (Halder *et al.*, 2019).

A elicitação é uma técnica aplicada tanto em cultivos *in vitro* quanto *in vivo*, sendo utilizada como ferramenta para incrementar a produção de biomassa e compostos metabólicos secundários (Nabi, Singh e Saffeulah, 2021). O processo ocorre a partir do reconhecimento do elicitor pela planta, por meio dos receptores presentes na membrana celular de suas células. Após o reconhecimento, ocorre um aumento nas concentrações de íons de cálcio no citoplasma, juntamente com uma considerável produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a ativação de MAP quinases, resultando na indução do metabolismo secundário (Shakya *et al.*, 2019). Assim, a aplicação desta técnica em plantas medicinais busca aumentar a concentração de substâncias com princípios ativos, como aquelas presentes no OE da *L. alba* (De Oliveira *et al.*, 2020; Jeyasri *et al.*, 2023).

Estudos anteriores já exploraram a elicitação por Metil Jasmonato e Ácido Salicílico, analisando os efeitos da aplicação desses elicitores em diversas plantas. Um exemplo é o trabalho de Silva-Santos *et al.* (2023), que investigou a ação destes fitohormônios em *L. alba* cultivada em casa de vegetação, examinando diferentes concentrações dos elicitores para determinar a aplicação mais eficaz. Entretanto, essas pesquisas são em sua maioria escassas quanto à aplicação *in-vivo* (Kandoudi *et al.*, 2022) e envolveram períodos mais longos de coleta de dados após a elicitação. Este trabalho, por sua vez, visa avaliar os efeitos na modulação do óleo essencial em um período mais curto de elicitação, utilizando as concentrações mais apropriadas conforme estudos anteriores.

Portanto, a presente pesquisa visa estudar e caracterizar os efeitos da elicitação *in vivo* pelo Ácido Salicílico e Metil Jasmonato em *Lippia alba*, isoladamente e combinados, para avaliar os efeitos na produtividade do óleo essencial e as mudanças fisiológicas causadas na planta durante um curto período de elicitação, utilizando análises bioquímicas e biométricas como parâmetro. A hipótese avaliada é que a elicitação combinada gera um efeito positivo na modulação bioquímica da planta em comparação com a elicitação isolada, devido a alteração de diferentes rotas metabólicas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. *Lippia alba*

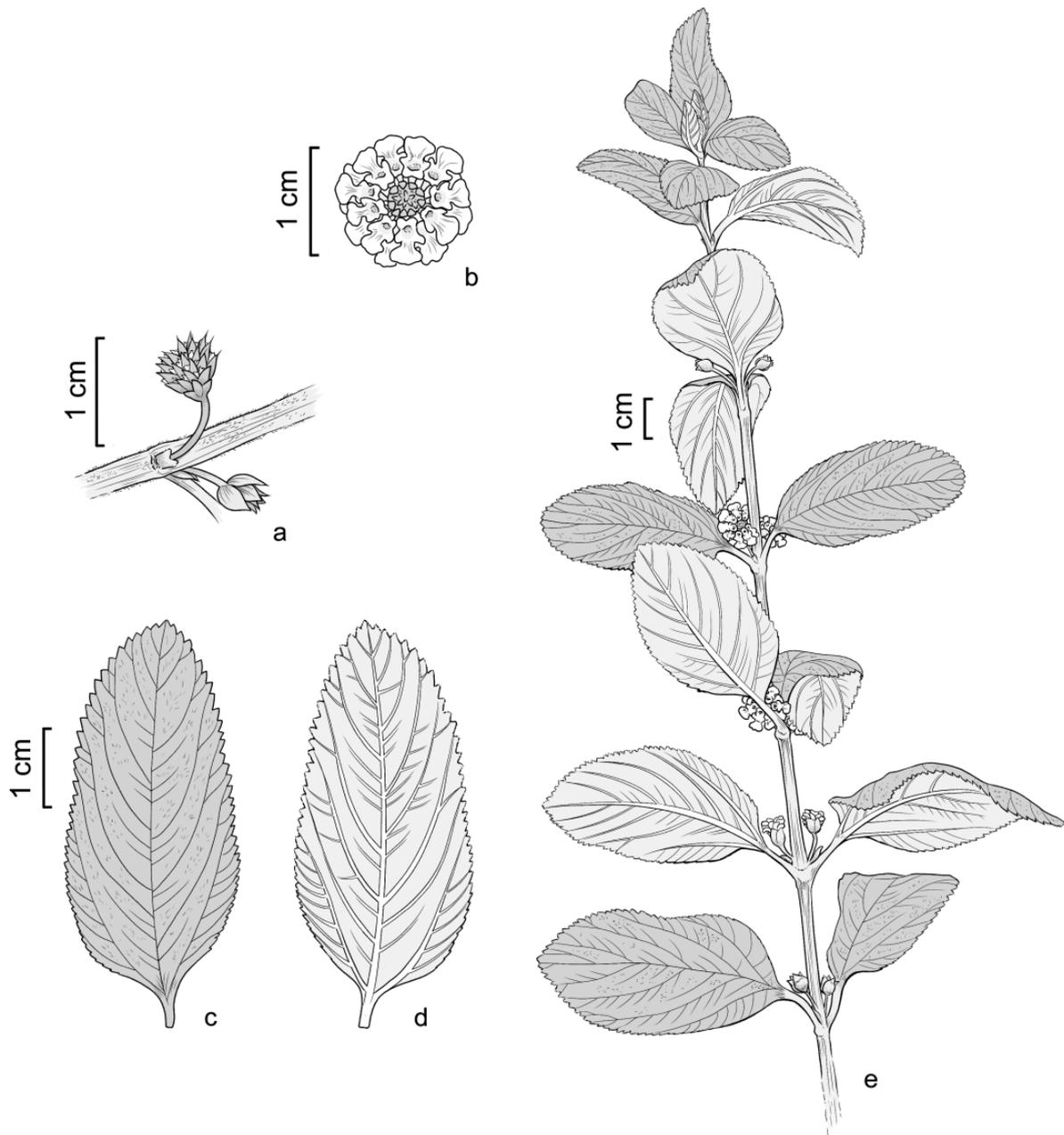
A família botânica Verbenaceae, de distribuição tropical e subtropical, possui mais de 90 gêneros, dentre eles o gênero *Lippia*, que engloba mais de 200 espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas. Espécies de *Lippia* são historicamente utilizadas como plantas medicinais, possuindo ações antimicrobianas, antioxidantes, anti reumáticas, antiulcerogênicas, antifúngicas, analgésicas, anti-inflamatórias e até mesmo antimaláricas, dentre outras propriedades (Almeida, 2011; Santos *et al.*, 2016).

A *Lippia alba* é um subarbusto aromático nativo e não endêmico no território brasileiro. Pode ser encontrada em quase todo o país, estando presente nos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Salimena e Cardoso, 2020). Existem múltiplos nomes comuns para a *L. alba*, como cidreira-de-arbusto, cidrilo, alecrim selvagem, carmelitana, falsa-melissa e chá-de-tabuleiro, sendo o mais popular “erva cidreira”. É frequentemente confundida com a *Melissa officinalis*, da família Lamiaceae, também chamada de erva cidreira (Almeida, 2011). No Nordeste é considerada uma PANC, pois além das folhas suas raízes também podem ser consumidas (Cordeiro, 2020).

A planta alcança alturas entre um metro e meio e dois metros, no máximo. Os ramos são finos e longos, com uma estrutura quebradiça, e arqueiam à medida que crescem. As folhas apresentam bordas serrilhadas e um ápice agudo, possuindo uma textura levemente pilosa e pecíolos curtos (Figura 1c e 1d). Seu crescimento ocorre com uma filotaxia oposta cruzada, e as folhas têm uma medida que varia de três a seis centímetros (Figura 1e). As flores são no formato de inflorescências axilares capituliformes, zigomorfas, de cor roxa ou rosada com a parte central amarelada (Figura 1a e 1b), enquanto os frutos são drupas globosas de cor rosa ou arroxeadas (Lorenzi e Matos, 2002; Camêlo *et al.*, 2011).

A *L. alba* é utilizada através de extratos alcoólicos, compressas, chás, banhos ou macerações para fins medicinais por conta de seus princípios ativos, entre eles seu óleo essencial (Julião *et al.*, 2003), que é composto principalmente por terpenos e fenilpropanoides (Nogueira Sobrinho *et al.*, 2021).

**Figura 1.** Morfologia da espécie *Lippia alba*, da família Verbenaceae; a. Botão floral e flor seca; b. Inflorescência; c. Superfície adaxial da lâmina foliar; d. Superfície abaxial da lâmina foliar; e. Terminação de um ramo, evidenciando a filotaxia e inflorescências.



Fonte: Autora (2024).

## 2.2. Óleo Essencial

O Óleo Essencial da *L. alba* é produzido principalmente nas folhas (Gomes *et al.*, 1993), sendo secretado por tricomas glandulares distribuídos na epiderme da planta (Dos Santos *et al.*, 2004). O rendimento do OE é maior nas épocas de crescimento vegetativo, quando comparado com o período de floração (Tavares *et*

*al.*, 2005), e nos períodos de seca, em comparação a períodos chuvosos (Dos Santos *et al.*, 2004).

Terpenos são os metabólitos secundários mais abundantes nos óleos essenciais das plantas em geral (Wei *et al.*, 2023). São solúveis em lipídios e fazem parte da estrutura de compostos vegetais como esteróides, fitohormônios e pigmentos. Os terpenos desempenham papéis cruciais na defesa direta e indireta das plantas contra a herbivoria e a invasão de patógenos, agindo como toxinas (Jan *et al.*, 2021). Também participam na termotolerância e na reprodução da planta, ao atrair polinizadores e dispersores de sementes. Além de sua importância na fisiologia e ecologia das plantas, os terpenos também são utilizados como compostos naturais de sabor e aroma e possuem efeitos benéficos à saúde humana (Nagegowda, 2010).

A biossíntese dos terpenos ocorre por meio de duas vias metabólicas independentes, a do ácido mevalônico (MVA) e a do fosfato de metileritritol (MEP), ocorrendo no citoplasma e no plastídeo da célula vegetal, respectivamente. A via do MVA utiliza Acetil-CoA como precursor para a síntese, resultando na produção de sesquiterpenos, enquanto a via MEP utiliza D-gliceraldeído-3-fosfato e piruvato, produzindo principalmente monoterpenos (Wei *et al.*, 2023).

As moléculas de terpenos apresentam estruturas variadas, mas todas são derivadas de unidades de isopreno. Por exemplo, os monoterpenos são formados por duas unidades de isopreno, enquanto os sesquiterpenos são compostos por três unidades (Wei *et al.*, 2023). Os sesquiterpenos e, especialmente, os monoterpenos são altamente voláteis devido ao menor número de unidades de isopreno em suas estruturas, resultando em moléculas menores em comparação com outros terpenos. Pela volatilidade alta, são eficientes sinalizadores pelo ar, conferindo o aspecto aromático na planta (Zhou e Pichersky, 2020). A composição geral do OE da *L. alba* é formada majoritariamente por monoterpenos, seguidos de sesquiterpenos e dos fenilpropanoides (Silva-Santos *et al.*, 2023).

Os componentes do OE das plantas de *L. alba* não são constantes, se alterando em quantitativo e qualitativo de acordo com o quimiotipo (MATOS *et al.*, 1996) e influências ambientais como estresses e adversidades, que modificam o metabolismo secundário da planta (Gupta, Sharma e Saxena, 2016). Quanto ao quimiotipo, os três principais descritos na literatura, denominados I, II e III, tem em destaque a presença de mirceno/citral, limoneno/citral e limoneno/carvona,

respectivamente. Preparações com os tipos I e II possuem uma ação calmante e espasmolítica, pelo citral, e analgésica, pelo mirceno. Quando preparado em chás, são eficazes em aliviar cólicas uterinas e intestinais, sendo então também um antiespasmódico. O quimiotipo III é utilizado principalmente como mucolítico, para facilitar a expectoração (Lorenzi e Matos, 2002). A grande variação na composição do OE sugere a existência de múltiplos outros quimiotipos, sendo quatro adicionais já estabelecidos na literatura (Hennebelle *et al.*, 2008). Além dos quimiotipos conhecidos, a variação de compostos encontrados no OE da *L. alba* pode ser influenciada pela elicitação, como observado por Silva-Santos (2023), que identificou compostos no perfil do OE após a aplicação de metil jasmonato e ácido salicílico que não estavam presentes no grupo controle.

### 2.3. Elicitores

Os compostos que formam o OE pertencem à classe dos metabólitos secundários. Estes se diferenciam dos primários, como os aminoácidos, nucleotídeos e pigmentos fotossintéticos, por não estarem presentes em todos os organismos vegetais, e sim somente em alguns grupos taxonômicos, não sendo essenciais para o desenvolvimento e metabolismo do organismo. Estão presentes em concentrações pequenas e têm como função auxílio à competição interespecífica com compostos alelopáticos, resistência ao estresse biótico, por patógenos, e também estresses abióticos, como seca, estresse oxidativo e por radiação UV (Nielsen, Temporiti e Cella, 2019), entre outras funções. Metabólitos secundários de plantas são amplamente utilizados pela indústria farmacêutica por suas propriedades ativas, e estão presentes direta ou indiretamente em um em cada quatro medicamentos (Halder *et al.*, 2019). A síntese desses metabólitos secundários pode ser desencadeada por meio da ação de elicitores químicos (KANDOUDI *et al.*, 2022), como por exemplo, o Metil Jasmonato (MeJa) e o Ácido Salicílico (AS).

Elicitores, sejam de origem física, química ou biológica, são compostos ou fatores que, quando aplicados, podem induzir mudanças fisiológicas e morfológicas, ativando o sistema de defesa da planta e aumentando sua produtividade e resistência (Luciano *et al.*, 2017). Devido ao aumento na produção de compostos do óleo essencial, a elicitação é amplamente utilizada em plantas medicinais (De

Oliveira *et al.*, 2020; Jeyasri *et al.*, 2023), como a *L. alba*. A eficácia dos elicitores depende da concentração aplicada e do tempo de exposição, podendo causar efeitos negativos caso em excesso (Silva-Santos *et al.*, 2023; De Souza Silva *et al.*, 2022).

Elicitores atuam simulando moléculas sinalizadoras da planta (Ruiz-García e Gómez-Plaza, 2013). O Metil Jasmonato (MeJa) e o Ácido Salicílico (AS) são fitohormônios amplamente reconhecidos. Ambos são naturalmente encontrados na planta, sendo de origem endógena. Desempenham um papel crucial como moléculas sinalizadoras no processo de aquisição de resistência a patógenos ou danos causados por herbivoria, alterando o metabolismo da planta (Beckers e Spoel, 2006). Além disso, estão envolvidos na resposta ao estresse abiótico, como a seca ou salinidade (Khan *et al.*, 2015). Quando aplicados de forma exógena, como elicitores químicos, desencadeiam a síntese de metabólitos secundários (Kandoudi *et al.*, 2022).

#### **2.4. Ácido Salicílico (AS)**

O ácido salicílico, também conhecido como ácido-2-hidroxibenzóico, é um composto fenólico formado por 7 carbonos. As enzimas envolvidas na biossíntese do AS são reguladas de acordo com fatores de estresse bióticos ou abióticos. O ácido salicílico, por sua vez, auxilia as plantas na resistência a esses fatores (Khan *et al.*, 2015), participando em mecanismos de defesa controlados geneticamente e na resistência sistêmica adquirida (RSA) (Kerbaui, 2019), que pode ser equiparada ao sistema imunológico inato nos animais. Pesquisas corroboram a associação do ácido com a resistência à contaminação por metais pesados (Zengin, 2014), aumento da atividade de enzimas antioxidativas (Janda *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 2013), tolerância salina (Khan *et al.*, 2014), resistência térmica (Janda *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2013) e resistência à seca (Alam *et al.*, 2013) quando aplicado de forma exógena.

O ácido salicílico também está relacionado com o crescimento e desenvolvimento da planta, fotossíntese, controle dos estômatos e produção de etileno (Jeyasri *et al.*, 2023). Quando aplicado em trigo, com apenas 10 dias após a elicitação, o AS é capaz de induzir um aumento considerável da biomassa fresca total, da altura da planta e do crescimento radicular (Haas *et al.*, 2015). A elicitação

com AS também está relacionada a um aumento no rendimento do óleo essencial de diversas espécies, além de modificar a diversidade de compostos em seu conteúdo (Ali, 2021).

## **2.5. Metil Jasmonato (MeJa)**

Jasmonatos (JA) são hormônios vegetais derivados de lipídios, encontrados em todos os órgãos vegetais que contém plastídeos. Os JA foram inicialmente identificados no óleo essencial de plantas de jasmim (*Jasminum grandiflorum* L.), dando origem ao nome (Kerbaudy, 2019). O Metil Jasmonato, por sua vez, é um composto volátil derivado do Jasmonato, possuindo ações similares.

Assim como o AS, está relacionado ao estresse biótico e abiótico (Jeyasri *et al.*, 2023). Exemplos de estresse abiótico em que o MeJa está envolvido incluem radiação ultravioleta, salinidade, lesões físicas e congelamento. Já no estresse biótico, o MeJa atua no controle dos mecanismos de defesa contra ataques de insetos e infecções por fungos ou bactérias (Kerbaudy, 2019). Além da resistência a danos por patógenos, o MeJa também está envolvido em processos como a maturação do pólen, desenvolvimento de flores e frutos, fotossíntese, senescência e crescimento radicular (Beckers e Spoel, 2006), além de funcionar como fonte de atração para polinizadores (Kerbaudy, 2019). Quando aplicado de forma exógena como elicitor é capaz de aumentar a quantidade de flavonoides, fenois totais e terpenos produzidos pela planta (Jeyasri *et al.*, 2023; Ruiz-García E Gómez-Plaza, 2013; Khavaldi *et al.*, 2019), sendo então de grande importância para a modulação do óleo essencial.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Analisar os efeitos da elicitação combinada e individual de ácido salicílico e metil jasmonato na produção de óleo essencial, parâmetros biométricos e bioquímicos de *Lippia alba* durante um curto período de elicitação.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Medir os aspectos biométricos e fisiológicos das plantas em cada tratamento.
- Investigar as respostas bioquímicas após a elicitação por Metil Jasmonato e Ácido salicílico, juntos e isoladamente.
- Avaliar o estresse oxidativo, por meio da quantificação de enzimas antioxidantes.
- Estabelecer correlações entre os parâmetros fisiológicos, morfológicos e bioquímicos frente à elicitação, utilizando a análise de cluster hierárquico (HCA).
- Quantificar o rendimento do Óleo Essencial para cada tratamento.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi montado na casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pertencente à Área de Botânica e ao Departamento de Biologia, estando localizado nas coordenadas 8°00'45.7"S 34°57'03.8"W.

Estacas de 15 cm de *L. alba* foram inicialmente cultivadas em um sistema de hidroponia com capacidade de 5 litros. A solução nutritiva no sistema foi composta por 0,3 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,12 g de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ; 0,06 g de  $KH_2PO_4$ ; 0,03 g de  $K_2HPO_4$ ; 0,25 g de  $K_2SO_4$ ; 5ml de solução de micronutrientes e 50 ml de ferro, segundo método de Murashige e Skoog (1962). As estacas foram transferidas para tubetes após desenvolverem raízes, para melhorar o período de estabelecimento. Os tubetes tiveram a composição de substrato comercial e areia, na proporção de 4:1, e receberam irrigação diária até a aclimação. Passado este período, foi realizado um transplante para sacos de polietileno com 5 kg de capacidade cada, contendo uma mistura de areia lavada, substrato comercial e condicionante na proporção de 4:1:1, respectivamente. O sensor HydroSense II CS 658 foi utilizado para que a umidade do substrato se mantenha a 70% da capacidade de pote. A irrigação ocorreu diariamente, de forma manual.

Para determinação do teor nutricional do substrato utilizado, amostras foram enviadas ao Laboratório de Química Ambiental dos Solos, do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O resultado obtido foi: pH 6,16; P (69,29 mg  $dm^{-1}$ ); Al, AL+H, Ca, K, Mg, Na ( 0,05; 3,31; 4,70; 0,78; 1,30; 0,30 cmolc  $dm^{-3}$ , respectivamente); MOS e COS (37,53 e 21,77 g  $kg^{-1}$ , respectivamente).

Após um período de 30 dias para o estabelecimento, as plantas foram distribuídas para os tratamentos com os elicitores e os grupos controle. A aplicação foi realizada por pulverização até o ponto de escoamento na parte aérea das plantas, com a adição de Tween®20 (polissorbato 20) como espalhante adesivo para aumentar a aderência do elicitor com a planta. Foram utilizadas as concentrações de 2 mM de Metil Jasmonato (MeJa) e 4 mM de Ácido Salicílico (AS), estabelecidas segundo o trabalho de Silva-Santos *et al* (2023). Os elicitores MeJa e AS foram aplicados isoladamente e em conjunto, mantendo as mesmas concentrações citadas anteriormente. Para evitar a retro contaminação por

partículas em suspensão, foram utilizadas medidas de isolamento temporal, espacial e físico. Foram formados dois grupos controle, sendo um deles diferente por conter etanol a 1%, o que se justifica pela necessidade de utilizar a mesma concentração de etanol para diluir o AS. No total, foram estabelecidos cinco tratamentos: Controle, Controle + etanol 1%, 2 mM de MeJa, 4 mM de AS e o 2 mM de MeJa + 4 mM de AS. Cada tratamento teve 5 repetições, totalizando 25 espécimes de *L. alba*. O experimento foi encerrado sete dias após a elicitação.

A Umidade relativa do ar (%), a Temperatura (°C) e a Luminosidade (PPDF) foram coletadas diariamente ao longo do experimento, visando obter as médias, máximas e mínimas de ocorrência dos dados ambientais. A umidade relativa observada durante o experimento foi de 64%, com mínima e máxima de 31 e 93%, respectivamente, enquanto a temperatura média calculada foi de 31°C, com mínima de 24,5°C e máxima alcançada de 43,6°C. O valor médio obtido para as taxas luminosas foi de 550  $\mu\text{mol}$  de fótons fotossintetizantes/ $\text{m}^2/\text{s}$ .

#### 4.1.1. Parâmetros Analisados

Foram realizadas avaliações de crescimento (altura, massa fresca, comprimento da raiz), análise da atividade enzimática (SOD, CAT e APX), solutos solúveis (prolina, carboidratos e proteína solúvel total), pigmentos fotossintéticos (carotenoides, clorofila a e clorofila b), marcadores oxidativos (MDA e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), teor relativo de água (TRA) e caracterização do perfil do óleo essencial (OE). As análises, excetuando as relacionadas ao OE, foram realizadas no Laboratório de Fisiologia de Plantas (LFP), do Departamento de Biologia da UFRPE.

#### 4.1.2. Avaliações de crescimento

O comprimento da parte aérea (cm), diâmetro do caule (mm) e número de folhas e inflorescências, quando presentes, foram medidos em quatro períodos diferentes. A avaliação foi realizada quinzenalmente, a partir do dia do transplante das plantas para os sacos de polietileno, e no momento da coleta do experimento. Nesta última análise, além dos parâmetros já mencionados, foi também medido a massa fresca foliar e radicular.

## 4.2. Análises bioquímicas

### 4.2.1. Pigmentos fotossintéticos

A clorofila a, b, total e carotenoides foram obtidos de acordo com o protocolo descrito por Bezerra Neto e Barreto (2011), sendo macerado 0,2 g de folhas frescas com acetona 80%. Após centrifugar o material (10.000 x g), as leituras no espectrofotômetro foram realizadas com o sobrenadante, nos comprimentos de onda 663, 645 e 470 nm, para quantificar clorofila a, clorofila b e carotenoides, respectivamente. A concentração de cada pigmento foi calculada de acordo com as equações de Lichtenthaler (1987).

### 4.2.2. Atividade enzimática

As folhas e raízes coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido, separadamente, até a formação de uma farinha. Adicionou-se 20% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona), para evitar oxidação do extrato. Para 1g de material macerado, foi adicionado 3 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM junto à EDTA 1 mM e DTT 3 mM. Em seguida, o homogeneizado passou por centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos à 4°C. O extrato bruto resultante foi armazenado a -20°C, e seu sobrenadante serviu para a análise da atividade enzimática e quantificação de proteínas (Bezerra Neto e Barreto, 2011). As análises enzimáticas realizadas foram: atividade da Ascorbato peroxidase (APX) (Nakano e Asada, 1981), catalase (CAT) (Havir e Mchale, 1987) e Superóxido Dismutase (SOD) (Giannopolitis e Ries, 1977).

### 4.2.3. Solutos solúveis e Marcadores Oxidativos

A quantificação das proteínas totais solúveis foi realizada segundo Bradford (1976), adicionando 3 ml do reagente de Bradford a 60 µl do extrato obtido para atividade enzimática. A leitura foi realizada no espectrofotômetro, a 595 nm. A prolina foi quantificada pela preparação de outro extrato, macerando o material vegetal fresco em ácido sulfossalicílico 3%, com uma centrifugação em seguida por 10 minutos a 2000g. Adicionou-se ácido ninidrina e ácido acético glacial ao sobrenadante, que seguiu para banho maria por 1h a 100°C e banho de gelo em seguida. Tolueno foi acrescido ao homogeneizado, que em seguida ficou em repouso para que ocorra separação de fases na solução. A leitura foi realizada no

espectrofotômetro a 520 nm. A análise dos carboidratos solúveis totais seguiu o protocolo de Bezerra e Barreto (2011), em reação com antrona e ácido sulfúrico. O extrato utilizado foi macerado com etanol 80%. Os marcadores oxidativos analisados foram o teor de malondialdeído (MDA) (Heath e Packer, 1968) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Alexieva *et al.*, 2001).

### 4.3. Análise do Óleo Essencial

As análises referentes ao Óleo Essencial foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, do Departamento de Química da UFRPE. Para a obtenção do óleo essencial, folhas de *L. alba* de cada amostra foram inicialmente pesadas e em seguida submetidas à hidrodestilação, em aparelho do tipo Clevenger, extraíndo o OE. O peso inicial utilizado foi o de 1g. A separação do óleo e da água se deu por diferença de densidade, separando as fases da mistura. Sulfato de sódio anidro foi utilizado para remover vestígios restantes de água no óleo. Passadas duas horas da extração, o rendimento do OE foi calculado utilizando a massa inicial das folhas como parâmetro. A determinação do rendimento total seguiu a seguinte fórmula:

$$R.O = \frac{M(\text{óleo})}{M(\text{material botânico})} \times 100$$

R.O – Rendimento de óleo

M (óleo) – Peso do óleo em g

M (material botânico) – Peso seco do material botânico em g

O óleo obtido foi armazenado em recipientes de vidro hermeticamente fechados, sendo mantido em temperaturas inferiores a 5 °C.

### 4.4. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Os resultados das análises foram processados no software estatístico “R” (R Core Team, 2023), sendo submetidos a análise de variância (ANOVA) após teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foi aplicado o teste SNK ( $p < 0,05$ ) e a análise de cluster hierárquico (HCA).

## 5. RESULTADOS

Seguindo os resultados da ANOVA (Tabela 1), todos os parâmetros de crescimento analisados obtiveram valores sem diferenças significativas entre si. Em relação aos pigmentos fotossintéticos, a clorofila b e os carotenoides mostraram diferenças entre os tratamentos ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) (Tabela 1), com a clorofila a e total se mantendo sem diferenças significativas. Quanto aos marcadores oxidativos analisados, MDA e peróxido de hidrogênio obtiveram ambos valores significativos, com um  $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente (Tabela 1). Nas análises enzimáticas, a ANOVA evidenciou variações significativas na atividade da APX e da SOD, ambas com um  $p < 0,01$  (Tabela 1). A enzima CAT não teve alterações quantificadas em sua atividade. Nas concentrações de metabólitos, apenas a prolina ( $p < 0,05$ ) apresentou resultados com variância significativa. Por fim, o rendimento do óleo essencial também obteve resultados significativos, com um  $p < 0,05$ . Detalhes sobre as diferenças observadas em cada parâmetro serão melhor elucidados nos tópicos seguintes.

**Tabela 1.** Resultados de ANOVA.

(continua)

Variável	Elicitor
NF	ns
Altura	ns
DC	ns
MF_folha	ns
MF_raiz	ns
MF_Caule	ns
Ca	ns
Cb	**
Ct	ns
Car	*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	**
MDA	***

**Tabela 1.** Resultados de ANOVA.

(conclusão)

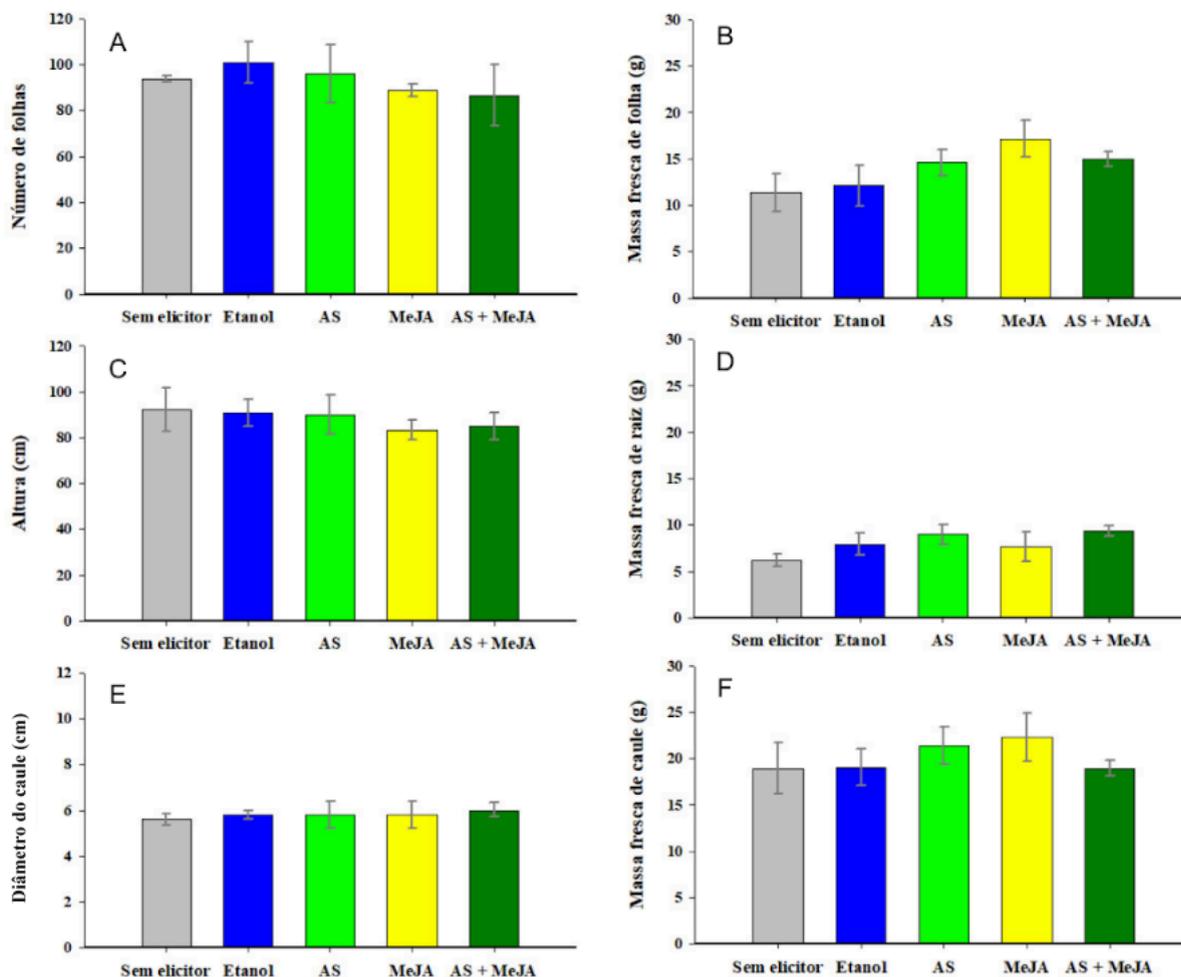
OE	*
SOD	*
APX	*
CAT	ns
Pro	*
CST	ns
Ptn	ns

NF = Número de folhas; Altura = Comprimento da parte aérea; DC = Diâmetro do caule; MF\_Folha = Massa fresca das folhas; MF\_raiz = Massa fresca da raiz; MF\_caule = massa fresca do caule; Ca = Clorofila a; Cb = Clorofila b; Ct = Clorofila total; Car = Carotenoides; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Concentração de peróxido; MDA = Malondialdeído; OE = Rendimento do Óleo Essencial; SOD = Atividade da superóxido dismutase; APX = Atividade da ascorbato peroxidase; CAT = Atividade da catalase; Pro = Concentração de prolina; CST = Carboidratos solúveis totais; Ptn = Proteínas solúveis totais; ns = Diferença não significativa; p<0,05 = \*; p<0,01 = \*\*; p<0,001 = \*\*\*.

### 5.1. Parâmetros de Crescimento

Não houve diferenças significativas entre os parâmetros de crescimento. Número de folhas, altura, diâmetro do caule e as massas frescas de folha, caule e raiz mantiveram valores similares entre todos os grupos experimentais (Figura 2).

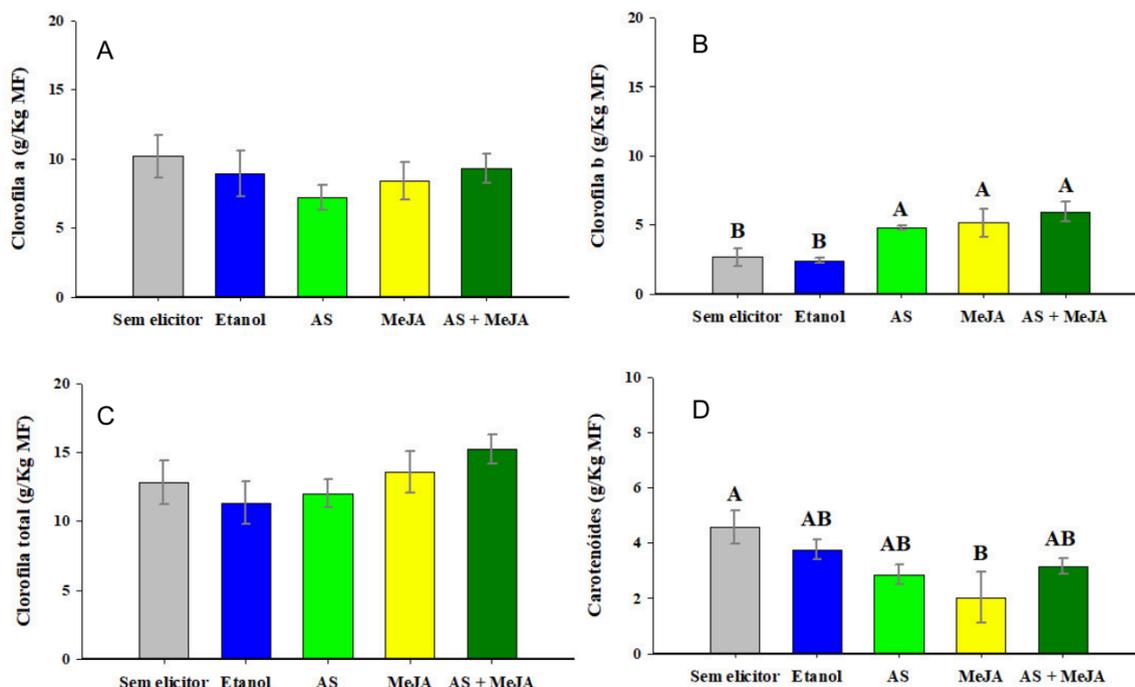
**Figura 2.** Parâmetros do crescimento obtidos em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM). (A) Número de folhas; (B) Massa fresca das folhas. (C) Altura da parte aérea; (D) Massa seca de raiz; (E) Diâmetro do caule; (F) Massa fresca do caule. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.



## 5.2. Pigmentos Fotossintéticos

Dentre os pigmentos fotossintéticos, as concentrações de Clorofila b e Carotenoides foram as mais afetadas pela elicitação. Em relação a Clorofila b, os tratamentos elicitados com AS e MeJa de forma isolada e combinada obtiveram concentrações maiores em comparação aos controles, que não tiveram diferenças significativas entre si (Figura 3B). Nos carotenoides, apenas a aplicação na *L. alba* de MeJa isolado alcançou concentrações significativamente menores, enquanto os outros tratamentos se mantiveram em valores intermediários no que se refere ao controle (Figura 3D). A quantificação de Clorofila a e Clorofila total, apesar das diferenças na Clorofila b, se manteve similar em todos os grupos (Figura 3A e 3B).

**Figura 3.** Concentração de Pigmentos Fotossintéticos obtidos em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM). (A) Clorofila a; (B) Clorofila b; (C) Clorofila total; (D) Carotenóides. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.

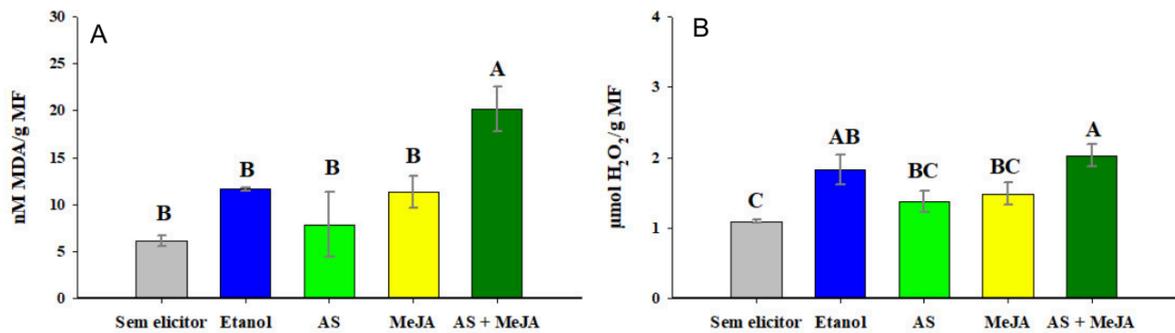


### 5.3. Análise oxidativa

O teor de MDA aumentou significativamente com a elicitação com as plantas do tratamento combinado apresentando um aumento em relação ao controle. Os tratamentos com MeJa e AS isolados não mostraram diferenças significativas (Figura 4A).

Os níveis de  $H_2O_2$  também foram afetados pela elicitação. A maior concentração encontrada foi no tratamento combinado com MeJa e AS, em relação ao controle. Plantas do controle com Etanol 1% apresentaram um aumento significativo na concentração de peróxido de hidrogênio em relação ao controle sem etanol. Os tratamentos isolados MeJa e AS obtiveram resultados similares aos dois controles (Figura 4B).

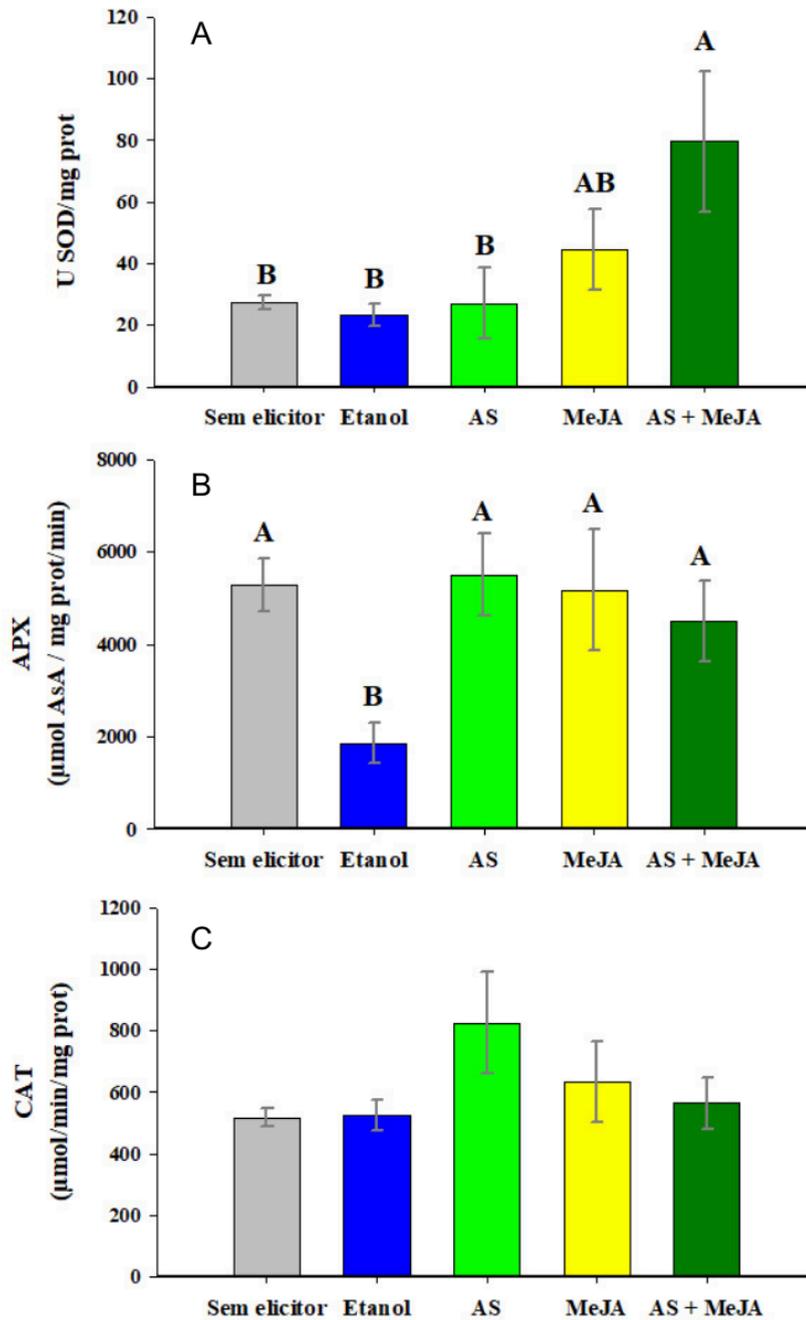
**Figura 4.** Marcadores oxidativos teor de malondialdeído (MDA) (A) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (B) em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.



Partindo para a atividade enzimática, a elicitação afetou a atividade da APX e da SOD entre os tratamentos. Não foram observadas diferenças na atividade da catalase (Figura 5C). No que se refere à SOD, o tratamento combinado diferiu dos demais. A aplicação isolada de MeJa, por sua vez, obteve valores intermediários de atividade enzimática para a SOD, situando-se entre o tratamento combinado e os tratamentos restantes, que se mantiveram similares entre si (Figura 5A).

Quanto à atividade da APX, apenas o controle com etanol apresentou diferença em relação aos outros tratamentos, com uma diminuição em comparação com o controle. O controle sem elicitor, o tratamento combinado e os tratamentos com aplicação isolada de AS e MeJa obtiveram médias consistentes entre si (Figura 5B).

**Figura 5.** Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) (A), Ascorbato peroxidase (APX) (B) e Catalase (CAT) (C) em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.

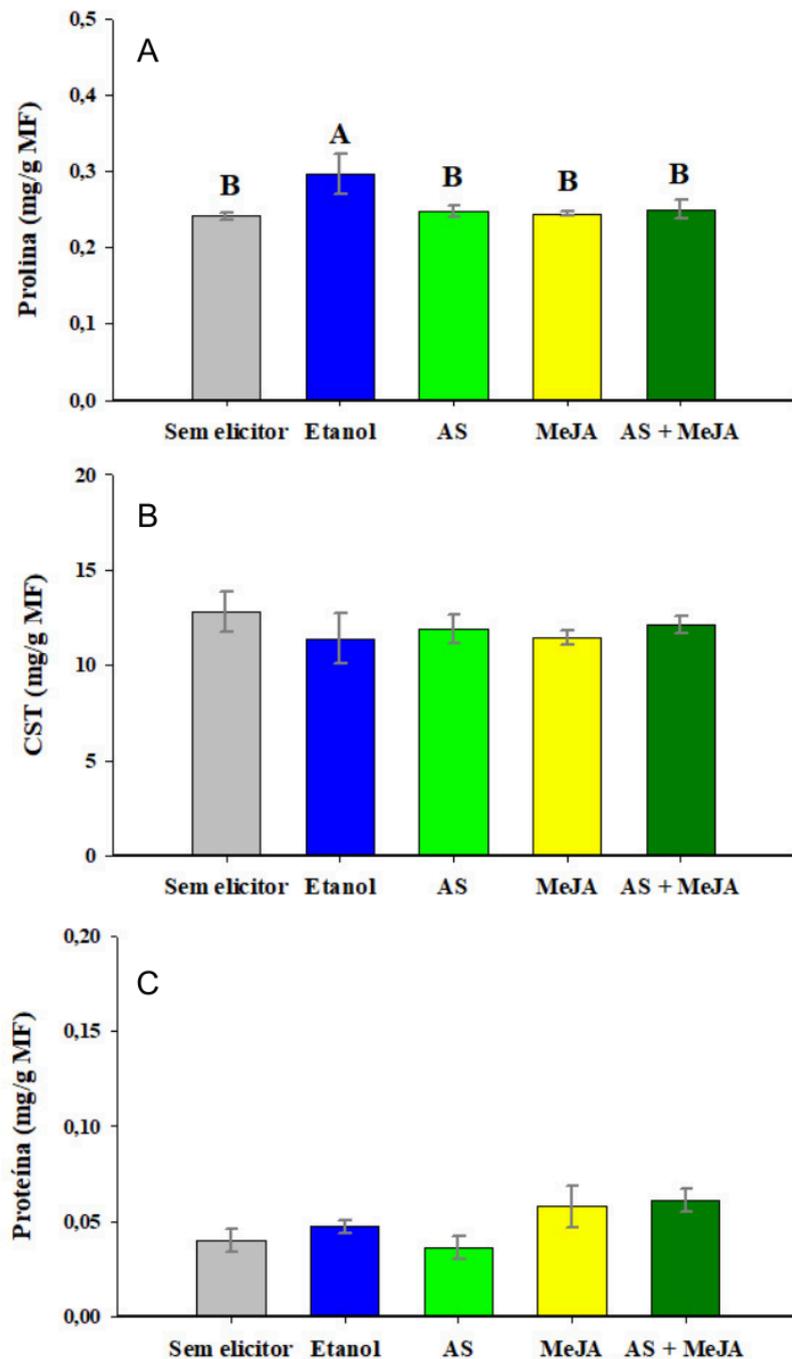


#### 5.4. Análise bioquímica dos metabólitos

O teor de proteínas e carboidratos solúveis totais não se alterou, mantendo valores semelhantes entre os controles e os tratamentos (Figura 6B e 6C), assim como nos parâmetros do crescimento. Uma diferença de menor magnitude, porém

estatisticamente significativa, foi encontrada no controle com etanol, que teve um aumento de em média 0,05 mg/g MF no teor de prolina (Figura 6A).

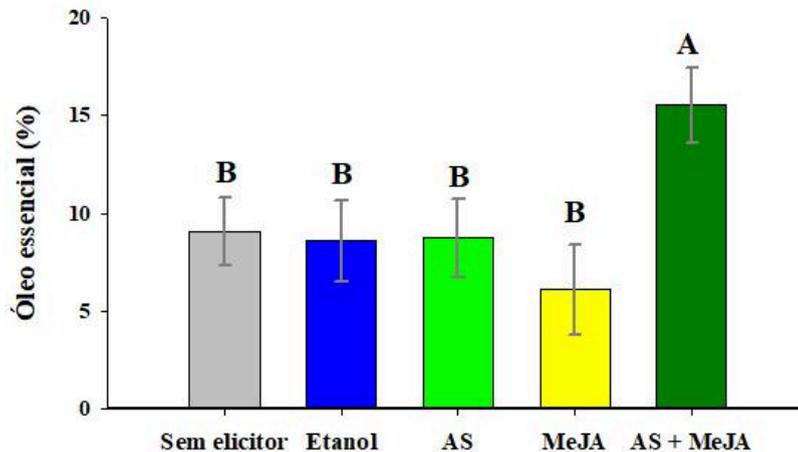
**Figura 6.** Teor de Prolina (A), Carboidratos solúveis totais (B) e quantificação das proteínas totais solúveis (C) em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.



### 5.5. Óleo essencial

As aplicações isoladas de AS e MeJa não afetaram a produção e consequentemente rendimento do óleo essencial, obtendo porcentagens similares aos tratamentos controle. O tratamento combinado, no entanto, teve um aumento em relação ao controle, sendo o único com diferenças significativas observadas (Figura 7).

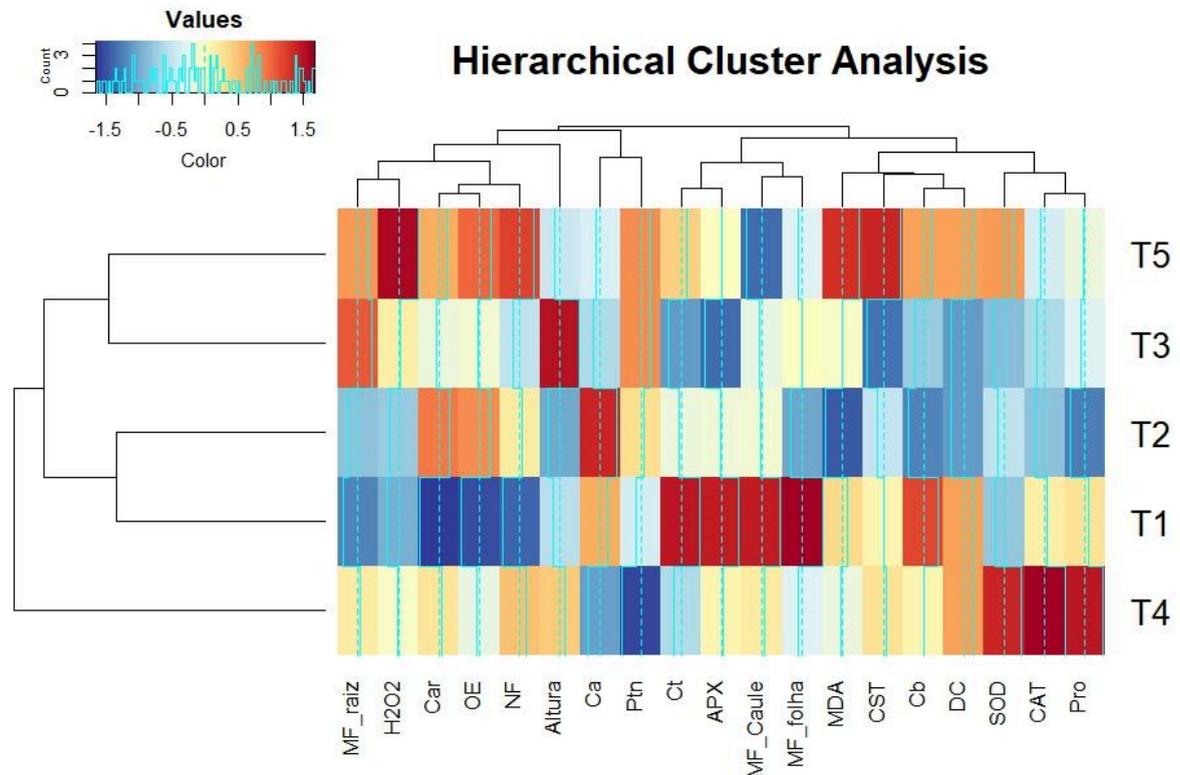
**Figura 7.** Rendimento do Óleo Essencial em porcentagem em relação a massa seca vegetal em folhas de *Lippia alba* para tratamentos controle, Etanol 1%, Ácido Salicílico (AS 4 mM), Metil Jasmonato (MeJa 2 mM) e elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, enquanto a ausência de letras indica falta de diferença. Intervalo de confiança representado pelas barras verticais.



### 5.6. Análise multivariada

A análise de cluster hierárquica (HCA) separou os tratamentos em grupos com base nas semelhanças e diferenças observadas entre eles, conforme mostrado nos clusters apresentados verticalmente no gráfico (Figura 8). Os tratamentos controle sem e com etanol 1%, representados por T1 e T2 respectivamente, se mantiveram agrupados em um dos clusters criados pela análise, enquanto os tratamentos AS e o combinado, representados por T3 e T5 respectivamente, formaram um segundo cluster. O tratamento T4, correspondente à aplicação isolada de MeJa, foi o que mais se diferenciou dos demais, se mantendo em um cluster externo e isolado dos anteriores (Figura 8).

**Figura 8.** Análise de Cluster Hierárquica.



T1= Controle; T2= Etanol 1%; T3= Ácido Salicílico (AS 4mM); T4= Metil Jasmonato (MeJa 2 mM); T5= Elicitação combinada (AS 4 mM + MeJa 2 mM); NF = Número de folhas; Altura = Comprimento da parte aérea; DC = Diâmetro do caule; MF\_Folha = Massa fresca das folhas; MF\_raiz = Massa fresca da raiz; MF\_caule = massa fresca do caule; Ca = Clorofila a; Cb = Clorofila b; Ct = Clorofila total; Car = Carotenoides; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Concentração de peróxido; MDA = Malondialdeído; OE = Rendimento do Óleo Essencial; SOD = Atividade da superóxido dismutase; APX = Atividade da ascorbato peroxidase; CAT = Atividade da catalase; Pro = Concentração de prolina; CST = Carboidratos solúveis totais; Ptn = Proteínas solúveis totais.

A HCA também formou agrupamentos com base nas variáveis obtidas nas análises, seguindo o mesmo princípio de similaridade e diferenças observadas, com os dados representados pelos clusters na horizontal do gráfico (Figura 8). A análise formou dois grandes clusters, com subdivisões secundárias dentro de cada um deles. O primeiro cluster englobou a Massa fresca da raiz, concentração de peróxido, carotenoides, clorofila a, proteínas solúveis totais, número de folhas, altura e rendimento do óleo essencial, ao passo que o segundo cluster agrupou as análises enzimáticas (CAT, SOD e APX), teor de MDA, prolina e carboidratos solúveis totais, clorofila b e total, diâmetro do caule e massa fresca de caule e de folha (Figura 8).

## 6. DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente, elicitores são capazes de provocar alterações morfológicas e fisiológicas nas plantas, modulando tanto o metabolismo primário, que envolve a produção de biomassa, quanto o metabolismo secundário, que inclui a síntese de compostos bioativos (Jeyasri *et al.*, 2023). Essas modulações podem contribuir positivamente para o enfrentamento de estresses ambientais, aumentando a sobrevivência da planta e sua produtividade (Jan *et al.*, 2021), como por exemplo em relação ao óleo essencial. A elicitação *in vivo* com Ácido Salicílico e Metil Jasmonato isolados já foi associada com um aumento no conteúdo de óleo essencial em *Lippia alba*, como visto por Silva-Santos *et al.* (2023). Dado o impacto significativo dos elicitores na modulação do metabolismo vegetal, este estudo partiu da hipótese de que a elicitação combinada potencializa ainda mais essas respostas bioquímicas pela ativação de vias metabólicas diferentes, superando os efeitos da elicitação isolada.

O Ácido Salicílico e o Metil Jasmonato são fitohormônios produzidos naturalmente na planta como forma de superar condições de estresse (Jeyasri *et al.*, 2023). No entanto, os mecanismos de proteção ativados para tal possuem um alto gasto energético (Silva-Santos *et al.*, 2023). A depender da concentração utilizada e da resposta da planta os elicitores podem causar efeitos deletérios no crescimento, a exemplo da redução em altura para o MeJa (Wang *et al.*, 2021) e menor desenvolvimento radicular para o AS (Pasternak *et al.*, 2019). As causas são variadas, podendo ocorrer pelo deslocamento de recursos (Huot *et al.*, 2014), inibição do ciclo mitótico (Noir *et al.*, 2013) e alteração na produção de hormônios, como giberelina em resposta ao MeJA (Heinrich *et al.*, 2013) e auxina em resposta ao AS (Pasternak *et al.*, 2019). Para garantir a produtividade do óleo essencial, é crucial que não ocorram grandes perdas na biomassa, pois isso resultaria em menos folhas disponíveis e, conseqüentemente, em uma menor quantidade de óleo a ser extraído.

No presente estudo, nenhum dos tratamentos apresentou efeitos negativos nos parâmetros de crescimento ou sinais de senescência, não havendo diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos elicitados, o que indica que a planta não sofreu efeitos deletérios em seu metabolismo primário. Em relação à fotossíntese, as concentrações observadas de clorofila não variaram muito entre os

tratamentos, havendo apenas um aumento na clorofila b nos que receberam elicitores, que não se refletiu na análise da clorofila total, visto que a clorofila a representa a maior porção. No entanto, plantas que receberam o MeJa isolado obtiveram uma concentração menor de carotenoides. Em tomates, concentrações entre 0.05 e 0.50  $\mu\text{M}$  de MeJa promoveram a biossíntese de Licopeno, enquanto concentrações entre 5 e 10  $\mu\text{M}$  geraram uma diminuição, o que sugere que a síntese de carotenoides pode ser afetada pelo MeJa a depender da dose aplicada (LIU et al., 2012). Em *L. alba*, Silva-santos (2023) observou uma diminuição nos carotenoides com a aplicação de 4 mM de MeJa, enquanto doses de 2 mM geraram um aumento, diferindo dos resultados do presente trabalho.

Elicitores, após serem reconhecidos pelas células vegetais, geram espécies reativas de oxigênio (EROs), que estimulam em seguida a produção de mecanismos de defesa enzimáticos e não-enzimáticos na planta (Yoshioka et al., 2011; Shakya et al., 2019). Apesar de causar danos oxidativos, os EROs fazem parte de uma cascata de regulação e adaptação contra estresses sofridos (Hu et al., 2020). Em balanço, ambos MeJa e AS são capazes de modular respostas contra o estresse oxidativo, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes, como a CAT, SOD e APX, e a produção de compostos, como os fenólicos e osmólitos (Zulfiqar e Ashraf, 2023), que auxiliam nesse processo. Dessa forma, podem contribuir para a neutralização das EROs, protegendo a planta contra danos celulares (Wang et al., 2021) (Mehdizadeh et al., 2024). A elicitação combinada com MeJa e AS aumentou a produção de compostos fenólicos, flavonoides e a atividade antioxidante em um cultivo de células de *Thevetia peruviana* (Mendoza et al., 2018).

Neste estudo, a CAT e a APX mantiveram uma atividade semelhante entre os tratamentos, enquanto a SOD obteve uma atividade maior no tratamento combinado em relação aos restantes, evidenciando uma modulação positiva. Silva-Santos (2023), entretanto, observou um aumento na atividade das enzimas CAT e APX nos tratamentos com MeJa e AS, apresentando resultados distintos dos obtidos neste estudo. O MDA, formado pela peroxidação lipídica por danos na membrana celular, é utilizado como marcador de estresse oxidativo, assim como a concentração de Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), um tipo de ERO. Plantas que receberam MeJa e AS em combinação tiveram níveis maiores de MDA, somado a uma concentração também maior de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , enquanto os tratamentos isolados mantiveram valores semelhantes aos do controle. No trabalho de Silva-Santos (2023), as concentrações

de MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminuíram nos tratamentos com os elicitores isolados nas concentrações. O resultado encontrado nesta pesquisa, embora indique estresse oxidativo e dano de membrana, não afetou a biomassa ou os pigmentos clorofila a e b, indicando efeitos negativos mínimos. O aumento das EROs no presente estudo sem aplicação de estresse, encontrado no tratamento combinado, pode ser atribuído a uma maior atividade de NADPH oxidases (Hu *et al.*, 2020), que pode ser modulada positivamente pela elicitação com MeJa e AS, principalmente em combinação, como visto por Rasoli e Gholipoor (2023) em *Echinacea purpurea*.

Os níveis de prolina, junto a outros metabólitos como os carboidratos solúveis, aumentam em decorrência do estresse oxidativo, como uma forma não enzimática de mitigar os efeitos das EROs (Yang *et al.*, 2021). As proteínas e carboidratos solúveis totais, assim como a concentração de prolina, se mantiveram sem alterações com a elicitação, o que é mais um indicativo de um bom funcionamento fisiológico e ausência de estresse. No controle com etanol 1% foi observado um aumento na prolina que, embora estatisticamente significativa, representa um acréscimo discreto em concentração, com poucas implicações fisiológicas.

Sabe-se que o conteúdo do óleo essencial pode ser modificado pela elicitação com MeJa e AS (Silva-Santos *et al.*, 2023; Jeyasri *et al.*, 2023; Ali, 2021), isolados ou em combinação (Mendoza *et al.*, 2018). O grupo que recebeu o tratamento combinado apresentou um aumento expressivo no rendimento do óleo, de 71 % em relação ao controle. O MeJa pode ter influenciado o rendimento do óleo essencial pela estimulação da atividade da enzima PAL, fundamental na produção de compostos fenólicos, pelo aumento da densidade dos tricomas glandulares e, principalmente, pela ativação de genes relacionados à síntese de terpenos (Khalvandi *et al.*, 2019), que são os principais componentes do OE. O AS, por sua vez, também pode ter influenciado o rendimento do OE pelo aumento nas glândulas secretoras de OE e na síntese de terpenos (Tounekti, Hernández e Munné-Bosch, 2013).

Os terpenos mais abundantes no óleo essencial de *Lippia alba*, os monoterpenos e sesquiterpenos, são produzidos a partir de precursores como Acetil-CoA, D-gliceraldeído-3-fosfato e Piruvato, a depender da via metabólica envolvida (Wei *et al.*, 2023). Os três precursores são, portanto, produtos da respiração celular e conseqüentemente do metabolismo primário (Kerbauy, 2019),

que não sofreu alterações deletérias segundo as análises realizadas, possibilitando o aumento na síntese dos terpenos.

O aumento significativo no rendimento do OE apenas foi observado na elicitação combinada. Isso sugere que o AS e o MeJa tiveram seus efeitos amplificados quando aplicados em conjunto, possivelmente devido a algum tipo de sinergia ou interação entre eles na modulação do metabolismo secundário. Os resultados da HCA (Figura 8) corroboram com esta hipótese. Primeiramente, é necessário avaliar a distinção entre os tratamentos aplicados. Como demonstrado em estudos recentes, o etanol pode exercer modulações no metabolismo das plantas, atuando como um elicitor (Bashir *et al.*, 2022; Silva-Santos *et al.*, 2023), o que justifica a necessidade de um tratamento separado para isolar seus efeitos. Neste estudo, foram observados alguns efeitos atribuídos ao etanol, como alterações na atividade da APX e concentração de prolina e  $H_2O_2$ . Apesar disso, os tratamentos controle e etanol 1% se agruparam em um único cluster, o que indica um isolamento adequado dos efeitos da elicitação com MeJa e AS, mantendo uma distinção clara entre os grupos controle e os elicitados. Em relação ao efeito dos elicitores, o tratamento com MeJa isolado formou um grupo externo, exibindo padrões mais distintos em comparação com os demais, enquanto o AS e o tratamento combinado se agruparam em outro cluster. Isso sugere que os mecanismos de ação do MeJa e do AS possuem diferenças fundamentais, reforçando a hipótese inicial de que eles ativam vias metabólicas distintas.

## 7. CONCLUSÕES

A aplicação combinada de Ácido Salicílico e Metil Jasmonato *in vivo* resultou em um aumento significativo no rendimento do óleo essencial de *Lippia alba*. Esse incremento ocorreu sem comprometer a taxa fotossintética ou a produção de biomassa da planta, o que indica que o metabolismo vegetal foi modulado de maneira eficaz. Além disso, os dados mostraram que a elicitação, nas concentrações testadas, não induziu sinais de estresse oxidativo significativo, o que sugere uma adaptação bem-sucedida da planta aos tratamentos aplicados.

Esses resultados destacam o potencial da elicitação como uma estratégia promissora para otimizar a produção de compostos bioativos em *Lippia alba*. A sinergia observada entre o Ácido Salicílico e o Metil Jasmonato aponta para a eficácia da combinação desses elicitores em maximizar a produção de óleo essencial, tornando esta abordagem uma ferramenta viável para melhorar o rendimento de metabólitos de interesse sem prejudicar a saúde ou o crescimento da planta, podendo ser uma alternativa eficiente para aumentar a produtividade em cultivos comerciais dessa espécie.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D.; NASCIMENTO, S. C.; SENA, K. X. F. R. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 3, p. 436-440, 2008.
- ALAM, Md Mahabub et al. Exogenous salicylic acid ameliorates short-term drought stress in mustard (*Brassica juncea* L.) seedlings by up-regulating the antioxidant defense and glyoxalase system. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 7, p. 1053, 2013.
- ALEXIEVA, V., et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, 24(12), 1337-1344, 2001.
- ALI, Barket. Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101884, 2021.
- ALMEIDA, MZ. Plantas Mediciniais [online]. 3ª ed. Salvador: EDUFBA, 2011.
- BARRS, H.D.; WEATHERLEY, P.E. A Re-Examination of the Relative Turgidity Techniques for Estimating Water Deficits in Leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 15, p. 413-428, 1962.
- BASHIR, Khurram et al. Ethanol-mediated novel survival strategy against drought stress in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 63, n. 9, p. 1181-1192, 2022.
- BECKERS, G. J. M.; SPOEL, S. H. Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. 8(1), 1–10, 2006.
- BEZERRA NETO, E.; BARRETO L.P. **Análises químicas e bioquímicas em plantas** Recife: UFRPE, Editora Universitária da UFRPE, 2011.
- BRADFORD, M. M.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, 1976.
- CAMILLO, F. C.. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, p. 21-27, 2017.
- CAMÊLO, L. C. A. et al. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva cidreira brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. Rev. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, 2011.
- CORDEIRO, S. Z. *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson. Universidade Federal do Rio de Janeiro (online), 2020. Disponível em: <http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/lippia-alba-mill-n-e-br-ex-britton-p-wilson>. Acesso em 16 jun. 2023.

COSTA, M.; DI STASI, L. C.; KIRIZAWA, M.; MENAÇOLLI, S. L.; GOMES, C.; TROLIN, G. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. Elsevier. **Journal of Ethnopharmacology**, v.27, p.25-33, 1989.

DE SOUZA SILVA, P. T. et al. Effect of biotic elicitors on the physiology, redox system, and secondary metabolite composition of *Lippia alba* (Mill.) cultivated in vitro. **South African Journal of Botany**, v. 147, p. 415-424, 2022.

DE OLIVEIRA, T., et al. Elicitação com quitosana no crescimento e nos compostos voláteis de *Mentha arvensis* in vitro. **Scientia Plena**, 16(4), 2020.

DOS SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R.; SOARES, A. A. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 35, n.2, p.377-383, 2004.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide Dismutases I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, 59, 309-314, 1977.

GUPTA, P.; SHARMA, S.; SAXENA, S. Effect of abiotic stress on growth parameters and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) raised in vitro. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, 2016.

GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; CONTI, A.; FILHO, A.W. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.74, p.29- 32, 1993.

HAAS, C. J. T.; GONZÁLEZ, G. A.; SAAVEDRA, A. L. Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de la raíz y biomasa total de plántulas de trigo. *Terra Latino americana* Chapingo, v. 33, n. 1, p. 63-68, 2015.

HALDER, M; SARKAR, S; JHA, S. Elicitation: a biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng. Life Sci.*,v.19, p. 826-1111, 2019.

HAVIR, E. A., & MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84(2), 450-455, 1987.

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

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *J. Ethnopharmacol.* v. 116, p. 211-222, 2008.

HEINRICH, M.; HETTENHAUSEN, C.; LANGE, T.; WUNSCH, H.; FANG, J.; BALDWIN, I. T.; WU, J. High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of

gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. **The Plant Journal**, 73(4), pp.591-606, 2013.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown (verbenaceae). Santa Maria, UFSM, Saúde Santa Maria, v. 33, n.1, p. 43-48, 2007.

HU, Chun-Hong et al. NADPH oxidases: The vital performers and center hubs during plant growth and signaling. **Cells**, v. 9, n. 2, p. 437, 2020.

HUOT, Bethany et al. Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. **Molecular plant**, v. 7, n. 8, p. 1267-1287, 2014.

JAN, R. et al. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 968, 2021.

JANDA, T., et al. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. **Planta**, v. 208, p. 175-180, 1999.

JEYASRI, R., et al. Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 153(3), 447-458, 2023.

JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 36-38, 2003.

KANDOUDI, W.; RADÁCSI, P.; GOSZTOLA, B.; ZÁMBORINÉ NÉMETH, É. Elicitation of Medicinal Plants In Vivo—Is It a Realistic Tool? The Effect of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on Lamiaceae Species. **Horticulturae**, 8, 5, 2022.

KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2019. E-book. ISBN 9788527735612. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527735612/>. Acesso em: 19 ago. 2024.

KHALVANDI, M.; AMERIAN, M.; PIRDASHTI, H.; KERAMATI, S.; HOSSEINI, J. Essential oil of peppermint in symbiotic relationship with *Piriformospora indica* and methyl jasmonate application under saline condition. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p.195-202, 2019.

KHAN, M.; IQBAL, R. et al. Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 11, p. e26374, 2013.

KHAN, M.; IQBAL, R.; ASGHER, M.; KHAN, N.A. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and

ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 67-74, 2014.

KHAN, M.; IQBAL, R.; FATMA, M.; PER, T.S.; ANJUM N.A.; KHAN, N.A. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.

LICHTENTHALER, H. K. " Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes." In *Methods in enzymology*, vol. 148, pp. 350-382. **Academic Press**, 1987.

LIU, L.; WEI, J.; ZHANG, M.; ZHANG, L.; LI, C.; WANG, Q. Ethylene independent induction of lycopene biosynthesis in tomato fruits by jasmonates. **Journal of Experimental Botany**, v. 63(16), p. 5751-5761, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LUCIANO, Á. J.; IRINEO, T. P.; OCAMPO-VELÁZQUEZ, R. V.; FERREGRINO-PÉREZ, A. A.; HERNÁNDEZ, A. C.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G. Integrating plant nutrients and elicitors for production of secondary metabolites, sustainable crop production and human health: a review. *Int. J. Agric. Biol* 19, 391-402, 2017.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *J. Essent. Oil Res.*, v. 8, p. 695-698, 1996.

MEHDIZADEH, L. et al. Salicylic acid elicitation effect on phenolic profile and antioxidant activity of *Mentha piperita* L. in relation to zinc concentration under soilless culture. **South African Journal of Botany**, v. 168, p. 509-517, 2024.

MENDOZA, D. 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.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, 1962.

NABI, N.; SINGH, S.; SAFFEULAH, P. Responses of *in vitro* cell cultures to elicitation: regulatory role of jasmonic acid and methyl jasmonate: a review. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57, 341–355, **2021**.

NAGEGOWDA, D. A. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS letters*, v. 584, n. 14, p. 2965-2973, 2010.

NAKANO, Y., & ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, 22(5), 867-880, 1981.

NAMDEO, A. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review, 2007.

NIELSEN, E.; TEMPORITI, M. E. E.; CELLA, R. Improvement of phytochemical production by plant cells and organ culture and by genetic engineering. **Plant cell reports**, v. 38, n. 10, p. 1199-1215, 2019.

NOGUEIRA SOBRINHO, A.C.; de MORAIS, S.M.; MARINHO, M.M.; de SOUZA, N.V.; LIMA, D.M. Antiviral activity on the Zika virus and larvicidal activity on the *Aedes* spp. of *Lippia alba* essential oil and  $\beta$ -caryophyllene. *Industrial Crops and Products*, v. 162, 2021.

NOIR, S. et al. Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. **Plant physiology**, v. 161, n. 4, p. 1930-1951, 2013.

PASTERNAK, T; GROOT, P.E; KAZANTSEV, V.F. et al. Salicylic Acid Affects Root Meristem Patterning via Auxin Distribution in a Concentration-Dependent Manner, **Plant Physiology**, v. 180, p. 1725-1739, 2019.

R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023.

RASOLI, F.; GHOLIPOOR, M. Interactive effects of salicylic acid and jasmonic acid on secondary metabolite production in *Echinacea purpurea*. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 10(1), p. 106-118, 2023.

RUIZ-GARCÍA, Y.; GÓMEZ-PLAZA, E. Elicitors: A Tool for Improving Fruit Phenolic Content. *Agriculture*, 3, 33-52, 2013.

SALIMENA, F.R.G.; CARDOSO, P.H. *Lippia in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020.

SANTOS, N.O.d.; PASCON, R.C.; VALLIM, M.A.; FIGUEIREDO, C.R.; SOARES, M.G.; LAGO, J.H.G.; SARTORELLI, P. Cytotoxic and Antimicrobial Constituents from the Essential Oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Medicines**, v. 3, 2016.

SHAKYA, P., et al. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 71, p. 70-82, 2019.

SILVA-SANTOS, L. et al. Elicitation with Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Increase Essential Oil Production and Modulate Physiological Parameters in *Lippia alba* (Mill) NE Brown (Verbenaceae). **Journal of Plant Growth Regulation**. 1-19, 2023.

TAVARES, E.S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 15(1): 1-5, 2005.

TOUNEKTI, T.; HERNÁNDEZ, I.; MUNNÉ-BOSCH, S. Salicylic acid biosynthesis and role in modulating terpenoid and flavonoid metabolism in plant responses to abiotic stress. *Salicylic acid: plant growth and development*, p. 141-162, 2013.

VAN DEN DOOL, H., & KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, 11(3), 463–471, 1963.

WANG, Y. et al. Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8568, 2021.

WEI, J.; YANG, Y.; PENG, Y.; WANG, S.; ZHANG, J.; LIU, X.; LIU, J.; WEN, B.; LI, M. Biosynthesis and the Transcriptional Regulation of Terpenoids in Tea Plants (*Camellia sinensis*). **International Journal of Molecular Sciences**.v. 24(8), 6937, 2023.

YANG, X. et al. Response mechanism of plants to drought stress. **Horticulturae**, v. 7, n. 3, p. 50, 2021.

YOSHIOKA, H. et al. Regulatory mechanisms of nitric oxide and reactive oxygen species generation and their role in plant immunity. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 216-221, 2011.

ZENGIN, Fikriye. Exogenous treatment with salicylic acid alleviating copper toxicity in bean seedlings. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B Biological Sciences**, v. 84, p. 749-755, 2014.

ZHOU, Fei; PICHERSKY, Eran. The complete functional characterisation of the terpene synthase family in tomato. **New Phytologist**, v. 226, n. 5, p. 1341-1360, 2020.

ZULFIQAR, F.; ASHRAF, M. Proline alleviates abiotic stress induced oxidative stress in plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 8, p. 4629-4651, 2023.