



SARA DOUSSEAU

**AÇÃO REGULADORA DE ELICIADORES NAS
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS,
ECOFISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E NA
PRODUÇÃO E QUALIDADE DE ÓLEO
ESSENCIAL DE *Piper mollicomum* Kunth**

LAVRAS - MG

2013

SARA DOUSSEAU

**AÇÃO REGULADORA DE ELICIADORES NAS CARACTERÍSTICAS
BIOQUÍMICAS, ECOFISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E NA
PRODUÇÃO E QUALIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper
mollicomum* Kunth**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Amauri Alves de Alvarenga

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Dousseau, Sara.

Ação reguladora de eliciadores nas características bioquímicas, ecofisiológicas, anatômicas e na produção e qualidade de óleo essencial de *Piper mollicomum* Kunth / Sara Dousseau. – Lavras : UFLA, 2013.

265 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Bibliografia.

1. Planta medicinal. 2. Jasmonato de metila. 3. Quitosana. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.925

SARA DOUSSEAU

**AÇÃO REGULADORA DE ELICIADORES NAS CARACTERÍSTICAS
BIOQUÍMICAS, ECOFISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E NA
PRODUÇÃO E QUALIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper
mollicomum* Kunth**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2013.

Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula	IFMG/BambuÍ
Dra. Fernanda Carlota Nery	UFSJ
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA

Dr. Amauri Alves de Alvarenga
Orientador

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
Coorientador

LAVRAS - MG

2013

**Dedico a minha filha amada Rachel Dousseau Silva, que está me
esperando nos braços do meu bondoso Deus!**

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, inspiração e por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais que sempre me incentivaram e por terem despertado em mim o interesse pelos estudos, através do exemplo diário.

Aos meus amados, esposo Lúcio e filhos Rachel, Lucas, Lineu e Levi, por todo apoio e compreensão pela minha ausência necessária ao me dedicar aos meus estudos e pesquisa, durante todos esses anos.

A minha querida irmã de coração Renata Gomes por estar ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

À Universidade Federal de Lavras pela formação que me proporcionou.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga pelos anos de orientação, confiança, incentivo e amizade, fundamentais para a minha formação acadêmica e crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro pelo apoio e confiança que sempre me dedicou e por ter sido àquele que despertou em mim o interesse pelo estudo da estrutura e função das plantas sob estresses ambientais.

Ao Marcelo Murad, pela amizade, companhia e apoio nos trabalhos de laboratório.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves e a Eloisa Leite do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, pela confiança e apoio na realização deste trabalho e de muitos outros.

A todos do Laboratório de Anatomia Vegetal pela confiança e apoio incondicional em todos os trabalhos executados.

À Claudia Labory pelo auxílio nas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Pedro Martins, Vanessa Foresti e Marcia Toyota, pelo apoio nas análises bioquímicas e ao Prof. Dr. Mario Lúcio Vilela Resende por ter permitido a utilização do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo.

Ao Taham, Lena, Tina, Odorêncio e Joel por sempre estarem disponíveis para qualquer coisa que precisei.

Aos professores Luis Edson Mota de Oliveira e Angela Maria Soares, pelo exemplo de dedicação ao trabalho e por ter contribuído de forma significativa para a minha formação.

Aos professores Renato Paiva, José Donizeti Alves e Antonio Chalfun Junior, por sempre acreditarem em mim e pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Aos professores João Paulo R. Alves Delfino Barbosa e Fabricio José Pereira, pela amizade e exemplo de dedicação à pesquisa.

À prof^a. Dra. Maria das Gracas Cardoso que despertou em mim o interesse pelo estudo da química orgânica.

Ao meu coorientador prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira que me ofereceu a oportunidade de estudar a qualidade dos óleos essenciais.

À prof^a. Dra. Cláudia Moraes de Rezende do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro e a todos os alunos do seu laboratório, especialmente Maristella, Thais, Gisele e Andréa, que me receberam tão bem e me auxiliaram nas minhas análises de óleo essencial.

A inesquecível Maristella Martineli e sua tia Dilceneia de Laia que permitiram a minha estadia em sua casa e pela inestimável amizade e companherismo que sempre me dispensaram.

Aos amigos Juliana Neves, Meline, Solange, Suerlani, Thiago, Giordane, Marcelo Rodrigues, Marcelo Padovani, e a tantos outros que tive a

oportunidade de conhecer, pelas prazerosas discussões e companherismo nos estudos.

Finalmente aos meus amados e queridos amigos do laboratório de crescimento e desenvolvimento de plantas (Amanda, Jean, Mariana, Izabel Chaves, Lara, Tulio, Letícia, Tássia, Fernanda Ventorim, Ingrid, Fernanda Carlota, Fabrício, alunos do BIC-Junior e muitos outros que passaram por lá durante todos esses anos), que sempre estavam disponíveis para me ajudar nas minhas inspirações e análises gigantescas durante toda a minha formação, trabalhando nas horas mais impróprias como a noite, finais de semana e férias.

Obrigada a todos! Sem o apoio de vocês eu nada teria feito!

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho, avaliar a eficiência eliciadora da quitosana e do jasmonato de metila sobre os metabolismos antioxidante e fenólico, as trocas gasosas e a anatomia foliar de *Piper mollicomum*, no sentido de adequar o sistema produtivo para aumento da produção de biomassa e da qualidade do óleo essencial. As soluções de quitosana nas concentrações de 2,5, 5 e 10 g L⁻¹ e de jasmonato de metila a 0,5, 2 e 8 mM, foram pulverizadas em todas as folhas das plantas após sete meses de cultivo. Como controle foram utilizadas plantas sem pulverizar e pulverizadas apenas com o solvente, sendo HCl a 0,05 N com pH ajustado para 5,5, para quitosana e Tween 20 a 0,1%, para jasmonato de metila. A quitosana e o jasmonato de metila foram eficientes em promover a atividade antioxidante e os fenólicos nas folhas em desenvolvimento e completamente expandidas. A aplicação de quitosana reduziu as trocas gasosas, sendo as folhas em desenvolvimento mais sensíveis à aplicação desse eliciador. A aplicação de jasmonato de metila a 0,5 mM aumentou a eficiência fotossintética e eficiência instantânea do uso da água, independente do estágio de desenvolvimento da folha. Ambos os eliciadores promoveram o acúmulo de biomassa no sistema radicular e não influenciaram o crescimento da parte aérea. A quitosana a 10 g L⁻¹ causou modificações na célula que podem ser classificadas como um resultado do desenvolvimento de morte celular programada. A aplicação de jasmonato de metila induz modificações estruturais que podem constituir vantagens na interação planta-patógeno ou planta-herbívoros. A aplicação de 10 g L⁻¹ quitosana reduziu o teor de óleo essencial de folhas e de raízes de *Piper mollicomum*, enquanto a menor concentração não alterou o teor nas folhas, mas aumentou nas raízes. A aplicação de quitosana a 5 g L⁻¹ e com jasmonato de metila a 0,5 mM são eficientes para a produção de óleo essencial, considerando principalmente a produção de dilapiol em raízes.

Palavras-chave: Planta medicinal. Jasmonato de metila. Quitosana.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of chitosan and elicitor methyl jasmonate on phenolic and antioxidant metabolism, gas exchange and leaf anatomy of *Piper mollicomum*, in order to adapt the production system to increase biomass production and quality essential oil. The solutions of chitosan in concentrations of 2.5, 5 and 10 g L⁻¹ and methyl jasmonate 0.5, 2 and 8 mM, were sprayed on all leaves of the plants after seven months of cropping. Were used as control plants without spraying and sprayed with solvent only, with 0.05N HCl with pH adjusted to 5.5 to chitosan and 0.1% Tween 20, for methyl jasmonate. Chitosan and methyl jasmonate were effective in promoting the antioxidant activity and phenolics in developing leaves and fully expanded. The chitosan reduced gas exchange, the leaves being more susceptible to developing this application elicitor. The application of methyl jasmonate 0.5 mM photosynthetic efficiency and increased efficiency instantaneous water use, regardless of the stage of leaf development. Both elicitors promoted biomass accumulation in roots and did not affect the growth of the shoot. Chitosan caused a 10 g L⁻¹ change in the cell which can be classified as a result of development of programmed cell death. The application of methyl jasmonate induces structural changes that may be advantages in plant-pathogen or plant-herbivore. The application of chitosan reduced the 10 g L⁻¹ essential oil content of leaves and roots of *Piper mollicomum*, while the lowest concentration did not alter the content in the leaves, but increased in roots. The application of the 5 g L⁻¹ chitosan and methyl jasmonate 0.5 mM are effective in producing essential oil, especially considering dilapiol in the production of roots.

Keywords: Medicinal plant. Methyl jasmonate. Chitosan.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	<i>Piper mollicomum</i> Kunth.....	13
2.2	Elicidores.....	17
2.1.1	Quitosana.....	18
2.1.2	Jasmonato de metila.....	30
3	OBJETIVOS.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	CAPÍTULO 2 Interferência de eliciadores no metabolismo de antioxidantes e fenólicos em folhas de <i>Piper mollicomum</i> Kunth...	74
1	INTRODUÇÃO.....	75
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1	Metabolismo antioxidante.....	80
2.2	Metabolismo dos fenólicos.....	82
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.1	Influência da quitosana.....	85
3.2	Influência do jasmonato de metila.....	92
4	CONCLUSÃO.....	100
	REFERÊNCIAS.....	102
	CAPÍTULO 3 Ação de eliciadores nas trocas gasosas de <i>Piper mollicomum</i> Kunth.....	112
1	INTRODUÇÃO.....	113
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	117
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	120
3.1	Influência da quitosana.....	120
3.2	Influência do jasmonato de metila.....	130
4	CONCLUSÃO.....	138
	REFERÊNCIAS.....	139
	CAPÍTULO 4 Ação de eliciadores na estrutura e ultraestrutura do limbo foliar de <i>Piper mollicomum</i> Kunth.....	147
1	INTRODUÇÃO.....	148
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	151
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	155
3.1	Influência do jasmonato de metila.....	155
3.2	Influência da quitosana.....	163
4	CONCLUSÃO.....	170
	REFERÊNCIAS.....	171
	CAPÍTULO 5 Ação de eliciadores na produção e qualidade do óleo essencial das folhas e raízes de <i>Piper mollicomum</i> Kunth....	177

1	INTRODUÇÃO	178
2	MATERIAL E MÉTODOS	181
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	185
3.1	Identificação dos constituintes	185
3.2	Influência da quitosana	211
3.3	Influência do jasmonato de metila	232
4	CONCLUSÃO	251
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	253
	REFERÊNCIAS	254

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem crescido a demanda por produtos naturais para controle de pragas e doenças fitopatogênicas, bem como, de metabólitos que sejam bioativos sobre organismos de elevada patogenicidade em humanos. Nesse contexto, as *Piperaceae* se destacam por conter um grande número de espécies produtoras de metabólitos de interesse comercial, dentre as quais estão *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum*, produtoras de óleo essencial com elevado teor de dilapiol e safrol, respectivamente. Nessa família, também merece destaque, *Piper nigrum*, denominada de pimenta-do-reino, condimento mundialmente conhecido e utilizado.

Dentre as *Piperaceae*, *Piper mollicomum*, conhecida popularmente como jaborandi, que embora ainda não seja cultivada comercialmente, possui potencial devido à sua utilidade medicinal. Possui ação comprovada como antibacteriana e antifúngica e é bastante utilizada na medicina popular para diversos fins. É produtora de óleo essencial com elevado rendimento e predominio de monoterpenos e os sequiterpenos (DUARTE et al., 2006; PENEDO, 2007; SANTOS et al., 2001).

A possibilidade de utilizar eliciadores na indução de metabólitos secundários tem sido crescente nos últimos anos, trazendo em menor custo de produção, que leva ao aquecimento do mercado e domínio dessa tecnologia pelo país, aumentando assim, a competitividade no mercado internacional. Nesse contexto, os compostos quitosana e jasmonato de metila se destacam por alterar o crescimento e o desenvolvimento de diversas espécies de vegetais, bem como induzir uma série de metabólitos de interesse comercial.

Diante do exposto, este estudo visa beneficiar a cadeia produtiva das plantas medicinais, ao buscar tecnologias que aumente a produtividade e a qualidade do óleo essencial de *P. mollicomum*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Piper mollicomum* Kunth

Piper mollicomum (*Piperaceae*) é conhecida popularmente como pariparoba, jaguarandi, jaborandi, jaborandi-manso e rabo-de-galo (GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006; BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008). É amplamente distribuída no Brasil, sobretudo nos Estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso e Goiás (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006).

É uma espécie primária com dispersão zoocórica encontradas em mata ciliar (RUSCHEL, 2004; MELO; DURIGAN, 2007; ARZOLLA et al., 2010). Seus exemplares são bastante frequentes na floresta ombrófila densa baixomontana, em altitudes entre 200–600 m, tanto em locais ensolarados quanto sombreados; ocorre também em restingas; muito comum em áreas antrópicas, como margens de estradas (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006; ARZOLLA et al., 2010).

Na figura 1 pode ser observada a fotografia do *P. mollicomum* em ambiente natural. O porte é arbustivo com altura variando entre 1 a 4 m, com ramos pilosos (CARVALHO-OKANO; ALVEZ, 1998; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; MEDEIROS; SENNA-VALLE; ANDREATA, 2005; GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006; BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008).



Figura 1 Fotografia do *P. mollicomum* em ambiente natural

As folhas são alternas, simples, com estípulas, pecíolo curto e piloso; limbo inteiro ovado-elíptica ou lanceolado-elíptica, base assimétrica, margem inteira, ápice acuminado; papirácea, dotadas de glândulas translúcidas, tricomas escabrosos na face adaxial, profusos, velutíneos e sedosos ao tato na abaxial; verde-escuro na face ventral e verde ligeiramente claro na face dorsal (CARVALHO-OKANO; ALVEZ, 1998; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; MEDEIROS; SENNA-VALLE; ANDREATA, 2005; GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006; BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008). Possui inflorescência em espiga isolada e curva, com flores de coloração amarelo-claras, quatro estames, ovário com estilete curto ou séssil, três estigmas filiformes (CARVALHO-OKANO; ALVEZ, 1998; GUIMARÃES;

GIORDANO, 2004; MEDEIROS; SENNA-VALLE; ANDREATA, 2005; GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006; BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008).

Os frutos são do tipo drupa obovoide, lateralmente achatado, reticulado, truncado, glanduloso com tricomas pubescentes no ápice, estigmas persistentes (CARVALHO-OKANO; ALVEZ, 1998; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; MEDEIROS; SENNA-VALLE; ANDREATA, 2005; GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006; BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008).

Embora *P. mollicomum* ainda não seja cultivada comercialmente, possui potencial devido à sua utilidade medicinal. Segundo um levantamento sobre depósitos de pedidos de patente realizado por Medeiros, Senna-Valle e Andreato (2005), essa espécie apresentou maior número de pedidos, com 13, devido ao uso medicinal em cosmético e na menopausa.

É utilizada na medicina popular para fluxo menstrual severo e como antileucorreica (CORRÊA; PENA, 1984; MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). As folhas em decocção são utilizadas para aliviar dor na coluna (MEDEIROS; FONSECA; ANDREATA, 2004; MEDEIROS; SENNA-VALLE; ANDREATA, 2005; MEDEIROS et al., 2007) e contra queda de cabelo (BRITO; SENNA-VALLE, 2011). Os frutos são empregados para tratar problemas estomacais, sendo também muito usados em doenças venéreas e suas raízes são utilizadas como mastigatórios, para anestésiar dores de dentes (PECKOLT; PECKOLT, 1888; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Extratos brutos obtidos por maceração das folhas secas em solução hidroalcoólica 70% e ressuspensão em dimetil-sulfoxido a 10% em água, demonstraram moderada ação antibacteriana frente às espécies de mollicutes *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum* (CORDOVA et al., 2010).

Frações isoladas do extrato metanólico bruto, obtido por maceração das folhas secas de *P. mollicomum*, apresentaram potencial fungicida contra

Cladosporium cladosporioides e *C. sphaerospermum*, sendo isolados dois cromenos (2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila e 8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila) e uma di-hidrochalcona (2',6'-dihidroxi-4'-methoxidi-hidrochalcona) (LAGO et. al., 2007; REIGADA, 2009).

A partir do estudo fitoquímico da fase diclorometânica das raízes secas de *P. mollicomum*, Jardim (2012), isolou duas amidas isobutílicas [2-Propenamida, 3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-(2E) e 2-Propenamida, 3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-(2Z)] e duas amidas pirrolidínicas [Pirrolidina, 1-[3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2-propenil-(E) e Pirrolidina, 1-[3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2-propenil-(Z)], além de um fenilpropanoide (2-Metoxi-4,5-metilenodioxipropilfenona).

De suas folhas secas é extraído óleo essencial com elevado rendimento (2,98%) e moderada ação antibacteriana contra *Escherichia coli*, com mínima concentração inibitória maior que 1,0 mg.mL⁻¹ (DUARTE et al., 2006).

Penedo (2007) realizou a quantificação e caracterização do óleo essencial de *P. mollicomum* coletadas no Jardim Botânico do Estado do Rio de Janeiro, obtido por hidrodestilação das folhas frescas, e identificou um monoterpeneo (α -Terpineol: 29,51%) e os sesquiterpenos não oxigenados (Z-Cariofileno: 3,14%, α -Santaleno: 1,58%, α -Guaieno: 2,39%, α -Buneseno: 10,25% e α -Farneseno: 2,74%).

Segundo Santos et al. (2001), o óleo essencial extraído por hidrodestilação das folhas frescas de *P. mollicomum* coletadas em um fragmento típico da Mata Atlântica brasileira do Estado do Rio de Janeiro, contém oito sesquiterpenos não oxigenados [δ -elemeno: 0,43%, β -elemeno: 0,87%, (Z)- β -farneseno: 5,7%, α -cariofileno: 4,23%, germacreno-D: 3,65%, (E,E)- α -farneseno: 2,03%, γ -cadineno: 0,92%, germacreno-B: 1,17%], quatro sesquiterpenos oxigenados [E-nerolidol: 23,20%, oxido de cariofileno: 3,07%,

epoxido de humuleno II: 2,29%, (E,E)-farnesol: 10,48%] e uma cetona (2-tridecanona: 4,29%) e um álcool (2-dodecanol).

2.2 Elicidores

Muitos estudos atuais que visam induzir as plantas a aumentar a produção de metabólitos específicos têm utilizado os eliciadores, que são compostos ou tratamentos, que simulam condições que alterem rotas metabólicas, afetando qualitativamente e/ou quantitativamente a síntese de moléculas bioativas (XU et al., 2008; SIRCAR; MITRA, 2008; MANDAL; MITRA, 2007).

O sucesso da elicitação na produção de metabólito secundário tem sido demonstrado por algumas pesquisas, utilizando eliciadores de origem biótica como os extratos de fungos patogênicos (MANDAL; MITRA, 2007) e de algas (CHANDÍA; MATSUHIRO, 2008), compostos como o jasmonato de metila e seus derivados (SHOHAEL et al., 2007; SIRCAR; MITRA, 2008), a quitosana (ZHANG et al., 2007), o ácido salicílico (LI et al., 2008; XU et al., 2008), e danos mecânicos (XU et al., 2008), bem como eliciadores abióticos, como modificações na concentração de CO₂ (ALI; HAHN; PAEK, 2005), luz ultravioleta (XU et al., 2008), temperatura (OLSEN et al., 2008), potencial osmótico (LIU; CHENG, 2008), e nutrição mineral (OLSEN et al., 2008).

As metodologias de aplicação de eliciadores que os estudos atuais apontam como economicamente viáveis e de valor no estudo da bioquímica e regulação dos metabólitos secundários são as que utilizam o sistema hidropônico (DESCHAMPS; SIMON, 2006), culturas de suspensão celular (SHOHAEL et al., 2007; ZHANG et al., 2007; SIRCAR; MITRA, 2008) e pulverização (XU et al., 2008). Devido à amplitude de concentrações utilizadas em função da forma de aplicação e da espécie estudada, torna-se de fundamental importância

investigar a atividade eliciadora sobre o metabolismo de plantas produtoras de metabólitos secundários de interesse econômico, visando à otimização do cultivo dessas espécies.

Nesse contexto, quitosana e jasmonato de metila se destacam como compostos sinalizadores de respostas de defesa sistêmica das plantas por alterar de forma efetiva a biossíntese de compostos secundários; no entanto, os modos de ação geralmente envolvem rotas multivariadas, que são específicas para cada vegetal.

2.1.1 Quitosana

Quitosana é um biopolímero hidrofílico formado por moléculas de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, como pode ser observado na figura 2 (RABEA et al., 2003). A maioria dos tipos comerciais de quitosana contém 70-100% de glucosamina e de 0-30% de unidades de N-acetilglucosamina (HUSSAIN; ABDEEN; HIFNI, 2009). A substância é solúvel em ácidos orgânicos diluídos como os ácidos acético, fórmico, succínico, láctico, tartárico, valérico, glicólico, cítrico e málico, também se dissolve em soluções diluídas de ácidos inorgânicos tais como os ácidos clorídrico e sulfúrico (HAFDANI; SADEGHINIA, 2011).

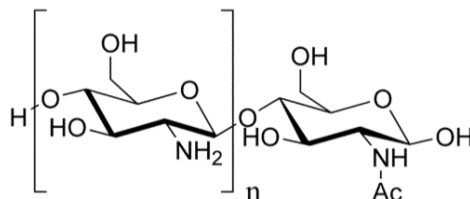


Figura 2 Estrutura da quitosana
Fonte: Rabea et al. (2003)

É o elemento estrutural principal do exoesqueleto de insetos e crustáceos (MUZZARELLI, 1997) e encontrado nas paredes celulares de uma variedade de fungos (BITTELLI et al., 2001). Segundo Namdeo (2007), a quitosana é liberada pela ação de enzimas de plantas em paredes celulares microbianas. É industrialmente obtida por desacetilação alcalina da quitina, como pode ser observado na figura 3 (RABEA et al., 2003). É preparada comercialmente como um subproduto das cascas de camarões, caranguejos e lagostas (BITTELLI et al., 2001).

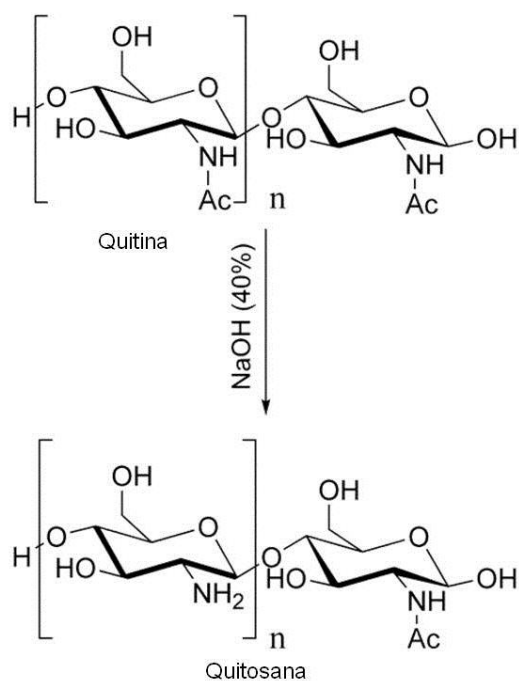


Figura 3 Obtenção industrial da quitosana
Fonte: Rabea et al. (2003)

O mecanismo de ação da quitosana nas plantas envolve a sua ligação a receptores presentes na membrana celular, mimetizando o fenômeno de reconhecimento que ocorre em uma interação entre a planta e o patógeno

(LABANCA, 2002). Chen e Xu (2005) isolaram uma proteína de ligação relacionada com a transdução de sinal da quitosana.

A quitosana tem demonstrado propriedades antivirais (POSPIESZNY; CHIRKOV; ATABEKOV, 1991; FAORO et al., 2001; CHIRKOV, 2002; KULIKOV et al., 2006; IRITI; FAORO, 2007), antibacterianas (SAVARD et al., 2002; RABEA et al., 2003) e antifúngicas (ALLAN; HADWIGER, 1979; REDDY et al., 2000), e tem sido exploradas para muitos usos agrícolas.

É um indutor de resistência sistêmica adquirida, que protege a planta contra ataques subsequentes (IRITI; FAORO, 2007). Promove a morte celular programada e a hipersensibilidade associadas a respostas em plantas (IRITI; FAORO, 2007; VASIL'EV et al., 2009; SAMUILOV et al., 2010; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). Têm sido utilizados para controlar doenças, ou reduzir a sua propagação, bem como para quelar nutrientes e minerais, impedindo patógenos do acesso aos mesmos, ou ainda para melhorar as defesas da planta (EL HADRAMI et al., 2010).

Outras respostas induzidas pela quitosana incluem aumento do H^+ e Ca^{2+} citosólicos, ativação de MAP-quinases (proteínas quinases ativadas por estímulos extracelulares) e síntese de proteínas relacionadas à patogênese (IRITI; FAORO, 2007). Além disso, a quitosana induz a formação de calose (KÖHLE; YOUNG; KAUSS, 1984; CONRATH.; DOMARD; KAUSS, 1989; IRITI; FAORO, 2007) e inibe proteases (WALKER-SIMMONS et al., 1984). Tem sido relatado que a quitosana estimula o acúmulo de ácido jasmônico (DOARES et al., 1995; IRITI; FAORO, 2007) e de ácido absísico (IRITI; FAORO, 2007; IRITI; FAORO, 2008; IRITI et al., 2009).

Na interação patógeno-planta, uma das primeiras respostas celulares é a explosão oxidativa, resultada da produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005; SHARMA et al., 2012). As ROS são importantes agentes tóxicos e regulatórios em plantas

(DEMIDCHIK, 2009; BHATTACHARJEE, 2012). O nível de ROS ou o estado redox da célula determinam o tipo de resposta, enquanto que a alta concentração inicia a morte celular, a baixas concentrações, induz genes de defesa e respostas adaptativas (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; BHATTACHARJEE, 2012).

As ROS são os anião superóxido (O_2^-), as moléculas de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), os radicais hidroxila (OH^-) e os oxigénio singuleto (1O_2) (SHARMA et al., 2012). Todas ROS são extremamente prejudiciais para os organismos em concentrações elevadas (SHARMA et al., 2012). Quando o nível de ROS excede os mecanismos de defesa, uma célula é dito estar em estado de "estresse oxidativo" (DEMIDCHIK, 2009; SHARMA et al., 2012).

As ROS são sempre formadas nas plantas durante o metabolismo normal, pelo vazamento inevitável de eletrons dos cloroplastos, mitocôndrias e membranas plasmáticas ou como um subproduto de vários processos metabólicos localizados em diferentes compartimentos celulares (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005; SHARMA et al., 2012; BHATTACHARJEE, 2012).

Durante as condições de estresse ambiental, a interrupção das cadeias de transporte de elétrons fotossintético e respiratório, bem como a ativação de NADPH oxidases e peroxidases, são os principais motivos para a geração e acúmulo de ROS (DEMIDCHIK, 2009). A ativação da cascata de sinalização induzida por patógenos promove a geração de ROS em cloroplastos, que desempenha um papel importante na sinalização para e/ou na execução de hipersensibilidade a morte celular em plantas (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; LIU et al., 2007b; TORRES; JONES; DANG, 2006; BHATTACHARJEE, 2012). Nos cloroplastos, a explosão oxidativa ocorre mais cedo do que nas mitocôndrias (LIU et al., 2007a).

O aumento da produção de ROS durante o estresse ambiental pode constituir uma ameaça para as células, causando peroxidação lipídica, oxidação

de proteínas, danos para os ácidos nucleicos, inibição de enzimas e ativação da morte celular programada (SHARMA et al., 2012).

No entanto, apesar da sua atividade destrutiva, ROS são bem descritos como mensageiros em uma variedade de processos celulares, incluindo a tolerância para o estresse ambiental (DESIKAN et al., 2001; NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2002; YAN et al., 2007; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; BHATTACHARJEE, 2012). Pode sinalizar a expressão de genes através da ativação de canais de íônicos de influxo de Ca^{2+} e efluxo de K^+ (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005; DEMIDCHIK, 2009).

A quitosana pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de genes indutíveis por ferimentos (KESSLER; BALDWIN, 2002) e patógenos (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; IRITI; FAORO, 2007). O estresse oxidativo desencadeado pela quitosana induz especialmente a produção de H_2O_2 e O_2^- (OROZCO-CARDENAS; RYAN, 1999; ROSSARD et al., 2006; LEI et al., 2011).

Assim como os demais ROS, o peróxido de hidrogênio pode ser diretamente tóxico ao patógeno (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; TORRES; JONES; DANG, 2006) e é conhecido por ser um mensageiro secundário, que desempenha um papel importante na atividade de muitas plantas, incluindo o crescimento e produção de metabólitos secundários (APEL; HIRT, 2004; GARG; MANCHANDA, 2009).

A diminuição da taxa de crescimento que algumas plantas apresentam sob estresse, que não só permitem a conservação de energia metabólica para fins de defesa, mas também pode reduzir o risco de danos hereditários, provavelmente envolve as ROS como sinalizadores (BHATTACHARJEE, 2012).

O H_2O_2 está envolvido com o fortalecimento da parede celular (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; ZHAO; DAVIS; VERPOORTE,

2005). Participa do cruzamento oxidativo ('*cross-linking*') de proteínas da parede celular formando, com a matriz de polissacarídeos, um grande polímero de várias glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, reforçando estruturalmente a parede celular (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Na última etapa da via de síntese de lignina, as peroxidases catalisam a polimerização dos monolignóis e utilizam o H_2O_2 como substrato (VANHOLME et al., 2010), portanto essa molécula dispara a química de lignificação (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Como mensageiro secundário, o H_2O_2 é responsável pela ativação da enzima ácido benzoico 2-hidrolase, responsável pela conversão do ácido benzoico em ácido salicílico, que é um composto sinalizador da resistência sistêmica adquirida (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; TORRES; JONES; DANG, 2006).

Como as ROS induzidas por eliciadores mediam a produção de metabolitos secundários ainda não é claro, mas sabe-se que a transdução de sinal que conduz à biossíntese de metabolitos secundários é uma rede complexa, que está intimamente relacionada com o mecanismo regulador de respostas de defesa da planta (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

Em algumas espécies o H_2O_2 induzido por eliciador promove o acúmulo de metabolitos secundários de plantas, enquanto em outras, O_2^- é o mediador para a produção induzida (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005). Segundo Lei et al. (2011), o acúmulo de H_2O_2 e O_2^- induzido por quitosana, provavelmente acelerou a conversão de ácido diidroartemisínico a artemisinina. Esses autores relatam que o resultado obtido está de acordo com a hipótese de que o ácido diidroartemisínico pode remover ROS produzindo a artemisinina como produto final estável. Por outro lado, segundo Fan et al. (2010), a ativação do sistema de defesa pela elicitação com quitosana provavelmente foi responsável pelo aumento na biossíntese de triterpenoides.

Se as ROS atuarão danificando ou sinalizando dependerá do delicado equilíbrio entre a sua produção e eliminação (TORRES; JONES; DANG, 2006; XU et al., 2007; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). Devido aos papéis multifuncionais das ROS, é necessário que as células controlem o nível de ROS firmemente para evitar qualquer dano oxidativo e não para eliminá-los completamente (SHARMA et al., 2012; BHATTACHARJEE, 2012).

Eliminação ou desintoxicação das ROS em excesso é conseguida por um eficiente sistema antioxidante que compreende os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012).

Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e guaiacol peroxidase (GPX), bem como as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa [peroxidase do ascorbato (APX), redutase monodeidroascorbato (MDHAR), redutase deidroascorbato (Dhar) e glutaciona redutase (GR)], enquanto que os não enzimáticos compreendem os compostos ascorbato, glutaciona, carotenoides, tocoferóis e fenólicos (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012).

A SOD desempenha um papel central na defesa contra o estresse oxidativo, catalisando a dismutação do O_2^- a oxigênio e H_2O_2 (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). O aumento na atividade da SOD é geralmente correlacionada com uma maior tolerância da planta contra o estresse ambiental (XU et al., 2007; SHARMA et al., 2012). Segundo Iriti e Faoro (2007a), a SOD é ativada durante o estresse oxidativo inicial após elicitación (IRITI; FAORO, 2007b). A aplicação de quitosana pode promover a atividade da SOD (XU et al., 2007; FAN et al., 2010; LEI et al., 2011).

A CAT catalisa a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; KARUPPANAPANDIAN

et al., 2011; SHARMA et al., 2012). Essa enzima têm uma taxa de rotatividade muito rápida, mas uma afinidade muito menor para H_2O_2 que APX (SHARMA et al., 2012). Segundo Willekens et al. (1997), a CAT é fundamental para a manutenção do equilíbrio redox durante o estresse oxidativo em plantas do tipo C_3 . O tratamento com quitosana aumentou a atividade da CAT (MANDAL, 2010; LEI et al., 2011; ZENG; LUO, 2012).

A APX é um componente central do ciclo ascorbato-glutationa e desempenha um papel essencial no controle dos níveis intracelulares de ROS e utiliza duas moléculas de ácido acetilsalicílico para reduzir H_2O_2 à água com uma geração concomitante de duas moléculas de MDHA (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). É considerada como uma das enzimas antioxidantes mais amplamente distribuídas em células de plantas e devido à maior afinidade para o H_2O_2 que a CAT, são eliminadoras eficientes sob condições de estresse (SHARMA et al., 2012). Segundo Lei et al. (2011), o tratamento com quitosana promoveu aumento na atividade da APX, semelhante ao observado para a CAT.

A elevada afinidade da APX pelo H_2O_2 , torna essa enzima capaz de desintoxicar a baixas concentrações, sendo muito útil para uma regulação fina de peróxido de hidrogênio, enquanto, a baixa afinidade da CAT e a velocidade de reação alta, torna-a candidata ideal para a eliminação sob condições de estresse elevado (NOCTOR; FOYER, 1998).

Os compostos fenólicos englobam diversos metabólitos secundários, como os flavonoides, taninos, ésteres hidroxicinamato e lignina (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). Também são importantes agentes antioxidantes devido à sua forte capacidade para doar elétrons ou átomos de hidrogênio, podem quelar íons de metais de transição, sequestrar espécies moleculares de oxigênio ativo e inibir a peroxidação lipídica, através do aprisionamento dos radicais lipídicos alcóxido (ARORA et al., 2000;

KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). Eles também são capazes de estabilizar as membranas, diminuindo a sua fluidez, o que acarretaria em uma redução na mobilidade dos radicais livres na bicamada lipídica, resultando na inibição da peroxidação lipídica devido a um abrandamento nas reações desses radicais (ARORA et al., 2000). Além disso, especialmente, os flavonoides e os fenilpropanoídicos são oxidados por peroxidase, agindo na eliminação de H₂O₂ (SHARMA et al., 2012).

A quitosana pode estar envolvida na via de sinalização para a biossíntese de compostos fenólicos (UTHAIRATANAKIJ; SILVA; OBSUWAN, 2007), proporcionando a indução de várias enzimas da rota desses compostos, como a fenilalanina amônia liase (ROMANAZZI et al., 2002; KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2003; KIM et al., 2005; CHENG et al., 2006; XU et al., 2007; CHAKRABORTY; KARUN; MITRA, 2009; MANDAL, 2010; SEDIGHEH et al., 2012). A rota dos compostos fenólicos conduz à síntese de muitos metabólitos secundários, como a lignina, antocianinas, flavonoides e isoflavonas, dentre outros (YU; MCGONIGLE, 2005).

A elicitação com quitosana promoveu aumento nos fenólicos totais (KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2003; KIM et al., 2005; RAHMAN; PUNJA, 2005; CHAKRABORTY; KARUN; MITRA, 2009; MANDAL, 2010; BAQUE et al., 2012; SEDIGHEH et al., 2012), flavonoides (TOCCI et al., 2010; BAQUE et al., 2012; SEDIGHEH et al., 2012), isoflavonoides (SHINDE; MALPATHAK; DEVANAND, 2009; UDOMSUK et al., 2011), flavonol (SEDIGHEH et al., 2012), naftoquinonas (THAWEEESAK et al., 2011), xantonas (TOCCI et al., 2012), antraquinonas (JIN et al., 1999), lignana lariciresinol (SEDIGHEH et al., 2012), glicosídeos feniletanoides (CHENG et al., 2006) e fenólicos presentes nos óleos essenciais como eugenol e metil eugenol (KIM et al., 2005) e o safrol (VALLE, 2003).

Pode atuar ainda na promoção da lignificação (TERRY; JOYCE, 2004). A lignina é um polímero fenólico complexo formado principalmente pelos álcoois hidroxicinamil, coniferílico e sinapil, com quantidades menores de álcool p-cumaril (VANHOLME et al., 2010). Diversos autores observaram que a quitosana promove um aumento no conteúdo da lignina total ou de seus precursores (XU et al., 2007; SIRCAR; MITRA, 2009; MANDAL, 2010; SEDIGHEH et al., 2012).

A aplicação de quitosana pode alterar o metabolismo das fitoalexinas (TERRY; JOYCE, 2004; IRITI; FAORO, 2007a). Fitoalexinas são metabólitos secundários sintetizados “de novo”, em resposta ao ataque de patógenos ou herbívoros (AHUJA; KISSEN; BONES, 2012). A indução da fitoalexina antraquinona pela quitosana tem sido bastante estudada (VASCONSUELO et al., 2003; VASCONSUELO; GIULIETTI; BOLAND, 2004; VASCONSUELO et al., 2005; BAQUE et al., 2012). Também induz as fitoalexinas risitina (REDDY et al., 2000), resveratrol (MEDINA-BOLIVAR et al., 2007), cumestrol (DURANGO et al., 2002), dentre outras.

Também foi observado aumento na concentração de compostos terpênicos, como nos monoterpenos mentol, mentona e pulegona (CHANG; SHIN; CHUNG, 1998), linalol (KIM et al., 2005; LOCKWOOD et al., 2007), limoneno (LOCKWOOD et al., 2007) e geraniol (KAHLOS; KIVIRANTA.; HILTUNEN, 1994), triterpenoides (FAN et al., 2010) e no sesquiterpeno lactonizado artemisinina (PUTALUN et al., 2007; LEI et al., 2011). Em *Pinaceae*, quitosana estimula a produção de monoterpeno ciclastes, enzima que está envolvida na produção de oleorresinas (LEWINSOHN; WORDEN; CROTEAU, 1994), bem como aumenta a síntese de monoterpenos e diterpenos (CROTEAU et al., 1987).

Quitosana aumenta a produção dos alcaloides tropânicos hiosciamina (SEVÓN; HILTUNEN; OKSMAN-CALDENTY, 1992; PITTA-ALVAREZ;

GIULIETTI, 1999) e escopolamina (PITTA-ALVAREZ; GIULIETTI, 1999), bem como dos alcaloides bis- indólicos, como a indirubina (KIM et al., 1997) e no alcaloide estemofolina (CHAICHANA et al., 2012).

É relatado ainda o aumento na produção de cumarinas simples, furanocumarinas, dihidrofuranocumarinas e alcaloides furoquinolônicos (ORLITA et al., 2008) e na lactona esteroideal vitanolídeo (CHAKRABORTY; KARUN; MITRA, 2009). Induz um aumento de 90% no éster alcaloide paclitaxel (ZHANG et al., 2000; ZHANG et al., 2007).

Modificações ultraestruturais também são evidenciadas pela aplicação de quitosana. Em células do mesófilo de tabaco estimulou o aparelho de síntese proteica (dimensão do nucléolo e quantidade e aumento das membranas da mitocôndria e do retículo endoplasmático rugoso) e, ao mesmo tempo, causou ativação do compartimento lítico, expressa no estímulo da formação de dictiosomas, elementos lisos ER e vacúolos citoplasmáticos (NAGORSKAYA et al., 2012). Esses autores observaram que em algumas células a quitosana causou consideráveis modificações destrutivas, como a condensação da cromatina nuclear e o colapso do citoplasma, que podem ser classificadas como um resultado do desenvolvimento de morte celular programada.

É referido como um antitranspirante eficaz para conservar o uso de água na agricultura (BITTELLI et al., 2001; IRITI et al., 2009). Segundo Bittelli et al. (2001), a aplicação foliar de quitosana induz o fechamento dos estômatos, resultando em diminuição da transpiração e conseqüente redução do uso de água, mantendo a produção de biomassa e o rendimento.

A quitosana induz a produção de espécies reativas de oxigênio mediada por peroxidase (catalase), resultando no fechamento estomático (SRIVASTAVA et al., 2009; KHOKON et al., 2010). O peróxido de hidrogênio é acumulado nas células-guarda durante o fechamento (LEE et al., 1999; IRITI et al., 2009). Segundo Srivastava et al. (2009), o óxido nítrico e o cálcio estão envolvidos

nesta resposta. A alcalinização citosólica é sinal que precede a produção de ROS e NO durante o fechamento estomático (GONUGUNTA; SRIVASTAVA; RAGHAVENDRA, 2009).

Os efeitos da quitosana nas células-guarda é semelhante ao observado pelo ácido absólico ou jasmonato de metila, indicando uma possível convergência nas vias de transdução de sinal que levam ao fechamento dos estômatos (SRIVASTAVA et al., 2009).

Lee et al. (1999), verificaram alterações negativas sobre a taxa fotossintética ao promover o fechamento estomático. No entanto, outros autores têm demonstrado que esse eliciador pode aumentar a fotossíntese em espécies como o manjericão (KIM et al., 2005) e do quiabeiro (MONDAL et al., 2012). Lee, Kim e Kim (2005) relataram aumento na respiração de brotos de soja.

A aplicação foliar de quitosana afetou as trocas gasosas de soja e de milho (KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2002). No primeiro dia após a aplicação foliar, a quitosana proporcionou uma diminuição da taxa de fotossíntese líquida da soja e do milho, no entanto, nos dias seguintes, houve um aumento. Para o milho esse aumento foi de 10%, no terceiro dia, correlacionado com o aumento da condutância estomática e a taxa de transpiração, enquanto que a concentração intercelular de CO₂ não diferiu. Contudo, para a soja o aumento foi de 8% no segundo dia, juntamente com um aumento na condutância estomática, na taxa de transpiração e na concentração intercelular de CO₂.

Embora algumas espécies apresentem redução na taxa de crescimento sob estresse (BHATTACHARJEE, 2012), o eliciador quitosana altera o crescimento vegetal de várias formas, sendo considerado um potenciador do crescimento e produção de várias espécies de interesse econômico (UTHAIRATANAKIJ; SILVA; OBSUWAN, 2007).

A aplicação foliar de quitosana promoveu aumento no crescimento vegetativo, no rendimento e na qualidade dos frutos de pepino (SHEHATA;

FAWZY; EL-RAMADY, 2012), de pimentão (GHONAME et al., 2010), do morangueiro (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010), do quiabeiro (MONDAL et al., 2012), do tomateiro (EL-TANTAWY, 2009) e do feijão-caupi (EL-TANAHY et al., 2012). Promoveu aumento na massa seca e a altura do manjeriço (KIM et al., 2005), no crescimento dos brotos de soja (LEE; KIM; KIM, 2005), no comprimento e massa fresca das raízes e parte aérea e a área foliar de feijoeiro (SHEIKHA; AL-MALKI, 2011) e na produção de arroz (Boonlertnirun et al., 2008). Induz ainda a floração de maracujá (UTSUNOMIYA; KINAI, 1998), gerbera (WANICHPONGPAN; SURIYACHAN; CHANDRKRACHANG, 2001) e *lisianthus* (OHTA et al., 1999; UDDIN et al., 2004).

2.1.2 Jasmonato de metila

O jasmonato de metila (MeJA) é o metil éster do fito-hormônio ácido jasmônico e caracteriza-se por conter um anel de ciclopentanona com uma cadeia pentenil inserida no C7, um grupo carbonila no C6 e um acetil metilado no C3 (Figura 4) (WASTERNAK; PARTHIER, 1997). São compostos lipofílicos, voláteis à temperatura ambiente (FRANCESCHI; GRIMES, 1991) que foram primeiramente isolados e identificados quimicamente como um constituinte do óleo essencial de *Jasminum grandiflorum* (DEMOLE; LEDERER; MEREIER, 1962).

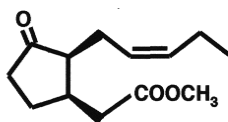


Figura 4 Estrutura do jasmonato de metila
Fonte: Sasaki et al. (2001)

O jasmonato de metila é biossintetizado pela via do ácido linoleico, pela rota octadecanoide, conforme descrito a seguir e representado na figura 5 (SEMBDNER; PARTHIER, 1993; SASAKI et al., 2001; HOWE; JANDER, 2008). Com a ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA2) ocorre a liberação intracelular do ácido linolênico (AL) da membrana plasmática. O AL é convertido a ácido 13-hidroperóxilinoleico (13-HPOT) pela enzima lipoxigenase (LOX) presente nos cloroplastos. Posteriormente, a enzima aleno óxido sintase (AOS) forma o ácido 12,13-epoxi-9,11,15-octadecatrienoico (OPDA), essa ciclopentanona sinaliza no citosol ou é convertido em ácido 12-oxo-cis,cis-10,15-fitodienoico (OPC), pela ação da aleno óxido ciclase (AOC). Nos peroxissomos, os OPC são reduzidos pela ação da ácido 12-oxo-fitodienoicoreductase (OPR) formando o ácido 3-oxo-2-(2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico (OPR), que após três passos de β -oxidação origina o precursor ácido jasmônico (JA), que pode ser metilado no citosol, pela ação da ácido jasmônico carboxilo metiltransferase (JMT) formando o MeJA. A reação inversa (de-metilação) é catalisada pela esterase MeJA (MJE).

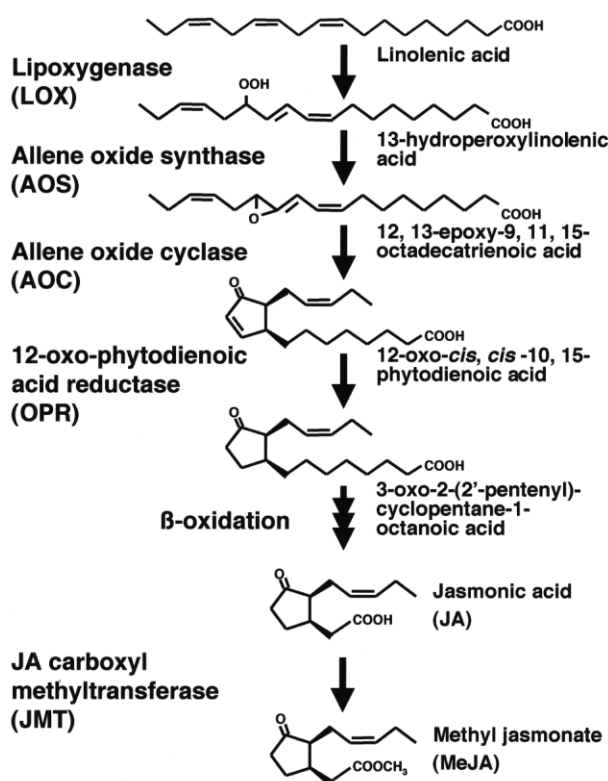


Figura 5 Rota biossintética do jasmonato de metila
 Fonte: Sasaki et al. (2001)

Cloroplastos e peroxissomas são considerados como sendo os principais sítios da biossíntese de JA (SASAKI et al., 2001). As enzimas necessárias para a iniciação da biossíntese de jasmonato, incluindo fosfolipase A1, foram identificadas no cloroplasto (ISHIGURO et al., 2001). As etapas de redução e oxidação ocorrem nos peroxissomas (STINTZI; BROWSE, 2000) e JMT está localizado no citoplasma (SONG et al., 2000).

As transcrições de JMT ocorrem em tecidos vegetativos e no desenvolvimento de flores, e acumulam localmente e sistemicamente quando os tecidos são feridos ou tratados com MeJA (TURNER; ELLIS; DEVOTO, 2002). O tratamento com metil jasmonato (MeJA) provoca resistência a herbívoros em

muitas espécies de plantas e o aumento da expressão de JMT, melhora as respostas induzidas pelo JA em *Arabidopsis* (TURNER; ELLIS; DEVOTO, 2002).

Segundo Turner, Ellis e Devoto (2002), MeJA pode funcionar como molécula sinal endógena na defesa das plantas. Por ser volátil, a sua produção pode funcionar como um sinal para modular comunicações intra-e interplanta na resposta de defesa (SEO et al., 2001; WASTERNAK; XIE, 2010). Plantas vizinhas ainda não infectadas adquirem resistência sistêmica adquirida (RSA) antes da presença do patógeno (SLESÁK; SLESÁK; GABRYŠ, 2001).

No entanto, Wu, Wang e Baldwin (2008), demonstraram que a resistência induzida pelo tratamento MeJA não é diretamente provocada pelo MeJA mas pelo seu produto de metilado, JA. Muitos estudos comprovam que o tratamento com o MeJA tem a capacidade de aumentar a síntese de enzimas da rota do octadecanoide (HARMS; RAMIREZ; PEÑA-CORTÉS, 1998; RANGEL et al., 2002; SIVASANKAR; SHELDRIK; ROTHSTEIN, 2000; HOWE et al., 2000; CHEONG; CHOI, 2003; JUNG, 2004). A indução dessas enzimas pelos produtos da rota sugere que existe uma regulação por retroalimentação positiva, servindo como indicador do nível elevado de JA (MAUCHER et al., 2000; STENZEL et al., 2003).

Yan et al. (2009) identificaram a proteína solúvel COI1 como receptor na resposta do ácido jasmônico (YAN et al., 2009). A conjugação do ácido jasmônico com o grupo carboxilo do aminoácido isoleucina para formar jasmonoil-isoleucina (JA-Ile), que pode ocorrer no citosol, é necessária para provocar as respostas induzidas por jasmonatos (ROHWER; ERWIN, 2008; VERGARA et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que JA, MeJA e OPDA não interagem eficientemente com COI1, somente JA-Ile (YAN et al., 2009; BROWSE, 2009). Sendo assim, JA-Ile é a forma ativa do jasmonato e é

um sinal importante para as respostas de defesa primária e desenvolvimento (WASTERACK; XIE, 2010).

A indução pelo jasmonato na expressão gênica é controlada por moléculas repressoras da sinalização, e cuja degradação sob estímulos ambientais, fornece uma rápida ativação do sistema (HOWE; JANDER, 2010). Nesse sistema, a proteína repressora JAZ é alvo de degradação via complexo proteossômico 26S dependente de ubiquitina, liberando a transcrição de genes responsivos à JA (THINES et al., 2007; CHINI et al., 2007). No modelo atual, JA-Ile promove o reconhecimento de JAZ com o complexo SCFCOII, marcando a proteína JAZ com ubiquitina. A COII é uma proteína F-box, e esse tipo proteico é o responsável pela especificidade do complexo SCF ao alvo. O modelo para a atividade de COII é baseado na sinalização por auxina, onde a ligação do complexo SCFTIR1 às proteínas repressoras Aux/IAA, resultam na expressão de genes dependentes à auxina (STASWICK, 2008).

MeJA e o JA, coletivamente referidos como jasmonatos, regulam muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, como germinação de sementes, crescimento da raiz, fertilidade, amadurecimento de frutos e senescência (CHEONG; CHOI, 2003; BROWSE, 2009). Eles atuam sinergisticamente ou antagonisticamente com outros fito-hormônios, tais como etileno, ácido salicílico, auxina e ácido abscísico (SASAKI et al., 2001).

É de potencial interesse a aplicação dos jasmonatos na produção de culturas hortícolas, uma vez que pode impactar o crescimento das culturas hortícolas, como para promover a formação de órgãos de armazenamento e a floração uniforme, bem como a superação de dormência (ROHWER; ERWIN, 2008). Também pode ser empregado na proteção contra os estresses ambientais e/ou de manuseio, como por exemplo, a aplicação de MeJA como um gás pode ativar defesas e evitar distúrbios pós-colheita em várias culturas hortícolas (ROHWER; ERWIN, 2008).

Por outro lado, o MeJA é emitido por plantas feridas (MEYER; RAUTENBACH; DUBERY, 2003) e, portanto, podem representar um meio de comunicação entre plantas danificadas. MeJA também tem atividade de feromonas, podendo ser utilizados para atrair artrópodes, sendo essa resposta potencialmente útil na produção de culturas hortícolas (ROHWER; ERWIN, 2008).

É bem relatado na literatura que o MeJA inibe o crescimento de raiz (STASWICK; SU; HOWELL, 1992; KIM et al., 2004; HORBOWICZ et al., 2011; RUIZ-MAY et al., 2011). O efeito no crescimento de raiz parece ser dose dependente, mas o efeito é variável entre as espécies. Em mudas de erva venenosa promoveu aumento em 10^{-6} e 10^{-7} M, mas inibiu em 10^{-5} M (DENG, 2005). Ao contrário, em trigo concentrações elevadas (10^{-5} a 10^{-3}) inibiu o crescimento da raiz, enquanto que a baixa concentração (10^{-8} a 10^{-7}) aumentou (LIU; ZHAO; LI, 2007b).

A inibição do crescimento de raízes é devido à desorganização celular e morte celular da coifa, bem como na perturbação da integridade da membrana mitocondrial e diminuição na biossíntese de ATP (RUIZ-MAY et al., 2011). Além disso, esses autores observaram alterações no acúmulo de várias proteínas envolvidos na energia e no metabolismo secundário, sugerindo uma mudança do destino metabólico que pode causar um aumento no acúmulo de metabolitos secundários.

Outros resultados do MeJA no crescimento também foram observados em diversas espécies. Hejari et al. (2005) relataram que o diâmetro de mudas, além da biomassa fresca e comprimento de raízes foram prejudicadas pelo tratamento com MeJA. Em canola o crescimento de folhas e de raízes foi reduzido, respectivamente, em 69% e 63% (ROSSATO et al., 2002). A aplicação de MeJA em soja promoveu redução da área foliar e na altura da planta, enquanto que aumentou o número de ramos (ANJUM et al., 2011). Por

outro lado, a aplicação de MeJA estimulou o crescimento de artemísia, expressado pelo maior comprimento e biomassa seca da parte aérea (AFTAB et al., 2011).

As trocas gasosas também são bastante influenciadas pelo jasmonato de metila. Os genes envolvidos na fotossíntese são reprimidos pela ação do MeJA, como ribulose difosfato carboxilase/oxigenase, proteína de ligação clorofila a/b, e captador de luz do complexo II (CHEONG; CHOI, 2003). A atividade fotossintética e o teor de clorofila foi fortemente diminuída em canola (ROSSATO et al., 2002). Em soja reduziu o teor de clorofila, o CO₂ intercelulares e a transpiração (ANJUM et al., 2011).

Por outro lado, o efeito do MeJA na fotossíntese em pinheiro silvestre foi dose dependente aos 100 dias de aplicação, aumentando em 10 mM e reduzindo em 100 mM, em relação ao controle (HEIJARI et al., 2005). Em artemísia, melhorou a eficiência fotossintética, expressada pela maior taxa fotossintética líquida, condutância estomática, interna de CO₂ e teor de clorofila total (AFTAB et al., 2011).

O MeJA provoca fechamento estomático em diversas espécies de plantas, de maneira semelhante ao ABA (SANZ et al., 1993; GEHRING et al., 1997; SUHITA et al., 2004; MUNEMASA et al., 2007, 2011; SAITO et al., 2008; HOSSAIN et al., 2011). Uma série de mensageiros são observados nas células guarda e precedem o fechamento estomático, como a produção de ROS (SUHITA et al., 2004; MUNEMASA et al., 2007) e de NO (NEILL et al., 2008), bem como a alcalinização citosólica nas células guarda (SUHITA et al., 2004; ISLAM et al., 2009). Segundo Gonugunta, Srivastava e Raghavendra (2009), a alcalinização citosólica precede a produção de ROS e NO.

Os jasmonatos ativam os mecanismos de defesa da planta em resposta aos estresses ambientais, como o ferimento causado por herbívoros e patógenos especialmente os necrotróficos (BROWSE, 2009), bem como aos estresses

abióticos, tais como temperatura baixa, seca e salinidade (CHEONG; CHOI, 2003; DEL AMOR; CUADRA-CRESPO, 2011).

A atividade biológica do MeJA é altamente dependente da sua concentração nas plantas. Em concentração baixa (1 até 10 μM) nos tecidos atua na indução da expressão gênica relacionada com a defesa da planta, sendo que em concentrações altas (acima de 50 μM) provoca senescência, induzindo a morte celular (MULLET; MASON, 1990).

Vários estudos o relacionam ao desencadeamento do processo de senescência e morte celular programada (FARMER, 2007, WASTERACK, 2007, BALBI; DEVOTO 2008). No entanto, Andi et al. (2001), verificaram que o MeJA não induziu o acúmulo de H_2O_2 e a morte celular, pelo contrário, inibiu as respostas de defesa induzidas por um composto patogênico, sugerindo que o MeJA pode atuar como um supressor endógeno para a resposta de defesa da planta, incluindo reação de hipersensibilidade. Genes que codificam proteínas de estresse de proteção e de defesa e aqueles que estão envolvidos na formação da parede celular também são regulados pelo MeJA regulada (CHEONG; CHOI, 2003).

Defesas estruturais também pode ser induzidas por MeJA (ROHWER; ERWIN, 2008). Essas defesas atuam negativamente sobre o herbivoro e podem ser depósitos cuticulares, espessamento da epiderme e do mesofilo, abundância de cristais, tricomas, fibras na folha (CORRÊA et al., 2008). A análise das seções transversais de folhas predadas, revelaram que a larva consome apenas tecido do parênquima do mesofilo, enquanto a epiderme, as drusas e os tecidos vasculares da nervura permanecem intactos (ALMEIDA-CORTEZ; MELO-DE-PINNA, 2006).

Em feijão Farouk e Osman (2011) observaram aumento da espessura da lâmina foliar, que coincidiu com o aumento da espessura dos parênquimas paliádico e esponjoso, bem como a da epiderme abaxial e adaxial e da nervura

central após aplicação de MeJA. Alterou ainda, a dimensão dos feixes vasculares, sendo que na maior concentração (10^{-5} M) reduziu a largura do feixe vascular.

Os tricomas podem contribuir para a defesa da planta em diferentes maneiras, sendo que glandulares é uma importante linha de defesa contra insetos herbívoros e patógenos (GLAS et al., 2012). Os glandulares acumulam ácidos, terpenos, gomas e/ou taninos, podendo ser tóxico ou promover repelência, enquanto que os tectores podem constituir uma barreira física (CORRÊA et al., 2008).

A densidade dos tricomas glandulares aumenta após aplicação de MeJA em tomate (BOUGHTON; HOOVER; FELTON, 2005). Enquanto que em capim-de-*rhodes*, MeJA exógeno reduz a área foliar, aumenta a densidade e altera a iniciação dos tricomas (número/1000 células epidérmicas), aumentando a iniciação dos tricomas longos mas reduzindo das glândulas sal (KOBAYASHI; YANAKA; IKEDA, 2010).

Outras estruturas acumuladoras de metabólitos secundários também podem ser estimuladas pelo MeJA. Por exemplo, a aplicação de MeJA induz aumento nos ductos de resina em espécies de gimnospermas (FRANCESCHI et al., 2002; HUDGINS; CHRISTIANSEN; FRANCESCHI, 2004; KREKLING; CHRISTIANSEN, 2002; MARTIN et al., 2002; HEIJARI et al., 2005; HUBER et al., 2005).

As ultraestruturas, principalmente cloroplastos e mitocôndrias, também podem ser influenciadas pelo MeJA. Em maracujá, a exposição ao MeJA causou modificação nos cloroplastos, uma vez que o estroma e o grana das membranas tilacoides tornaram-se desorganizados (RANGEL et al., 2002). Zhang e Xing (2008) demonstraram que dependendo da concentração aplicada no vegetal, o MeJA induz a produção de ROS, causa uma série de alterações na dinâmica mitocondrial incluindo sua distribuição, diminui o potencial transmembrana,

provoca severas modificações ultraestruturais em organelas celulares e declínio da eficiência fotoquímica e da taxa de crescimento vegetal.

O MeJA induz a explosão oxidativa, com a geração de H_2O_2 (GARRIDO et al., 2003; PARRA-LOBATO et al, 2009; SOARES et al., 2010; AFTAB et al., 2011; ALMAGRO et al., 2012; LIANG et al., 2012) e de O_2^- (ALI et al., 2006; PARRA-LOBATO et al, 2009; AFTAB et al., 2011). Além da produção de H_2O_2 , o MeJA é um sinal que desencadeia o aumento na concentração citosólica de Ca^{2+} e de óxido nítrico (ALMAGRO et al., 2012). Esse aumento no Ca^{2+} citosólico é devido ao influxo através dos canais permeáveis de Ca^{2+} , que por sua vez, é necessário para a ativação da produção de óxido nítrico.

MeJA exógeno também estão envolvidos na regulação da atividade das enzimas antioxidantes (PARRA-LOBATO et al., 2009; ANJUM et al., 2011). Diversos autores relatam que o MeJA promove aumento na atividade das enzimas antioxidantes, SOD (COMPAROT et al., 2002; JUNG, 2004; AFTAB et al., 2011; ANJUM et al., 2011), APX (COMPAROT et al., 2002; ALI et al., 2006; PARRA-LOBATO et al., 2009; SOARES et al., 2010) e CAT (JUNG, 2004; PARRA-LOBATO et al., 2009; MANDAL, 2010; AFTAB et al., 2011; ANJUM et al., 2011). Por outro lado, resultados distintos foram observados, como a redução na atividade da SOD (ALI et al., 2006; SOARES et al., 2010) e da CAT (COMPAROT et al., 2002; ALI et al., 2006; SOARES et al., 2010).

Fenólicos antioxidantes também são acumulados após aplicação de MeJA, como antocianinas fotoprotetoras das células da epiderme (JUNG, 2004). Por outro lado, See, Bhatt e Keng (2011), verificaram que o acúmulo de antocianinas foi dose dependente, aumentando nas concentrações mais baixas e reduzindo nas mais elevadas. Também aumenta a produção do potente antioxidante catequina (TASSONI; DURANTE; FERRI, 2012).

A aplicação de MeJA reduziu a peroxidação lipídica da membrana, o que foi provavelmente, devido à ativação do sistema antioxidante enzimático (ANJUM et al., 2011; AFTAB et al., 2011).

Jasmonatos também estão envolvidos na regulação de genes do metabolismo secundário (CHEONG; CHOI, 2003). Galis et al. (2006) identificaram um fator de transcrição regulado por MeJA que induz uma série de genes do metabolismo dos fenilpropanoide, além de dirigir o acúmulo de vários fenilpropanoides. Diversas enzimas da rota dos fenólicos são induzidas, dentre as quais a fenilalanina amônia liase se destaca (MIZUKAMI; TABIRA; ELLIS, 1993; GALIS et al., 2006; KIM et al., 2007; SIRCAR; MITRA, 2008; XIAO et al., 2009).

A elicitação com MeJA promoveu aumento nos fenólicos totais (KIM et al., 2006; KIM et al., 2007; MANDAL, 2010), ácidos fenólicos derivados cafeicos, como o ácido cafeico (KIM et al., 2006; KIM et al., 2007) e rosmarínico (MIZUKAMI; TABIRA; ELLIS, 1993; KIM et al., 2006; XIAO et al., 2009), bem como antraquinonas (BULGAKOV et al., 2004), isoflavonoides (KORSANGRUANG et al., 2010), estilbenos totais (TASSONI; DURANTE; FERRI, 2012) e fenólicos presentes nos óleos essenciais como eugenol (KIM et al., 2006).

Pode atuar ainda na promoção da lignificação estimulando enzimas da biossíntese de lignina como a cinamil álcool desidrogenase (MANDAL, 2010) e o conteúdo da lignina total (MANDAL, 2010; SIRCAR et al., 2012).

A aplicação de MeJA pode alterar o metabolismo das fitoalexinas (AHUJA; KISSEN; BONES, 2012). Induz as fitoalexinas antraquinona (BULGAKOV et al., 2002), medicarpina (NAOUMKINA et al., 2007), capsidiol (MA, 2008), cumestrol (KORSANGRUANG et al., 2010), deoxiantocianidinas (LIU et al., 2010) e resveratrol (VEZZULLI et al., 2007; BELCHÍ-NAVARRO et al., 2012)

Os compostos terpênicos são bastante influenciados pelo MeJA. Aumento nos monoterpenos linalol (HUBER et al., 2005; KIM et al., 2006; HARE, 2007) e limoneno (HARE, 2007; ZHAO et al., 2010). Aumentou também os monoterpenos (acetato de bornilo, canfeno, mirceno, α e β -pineno, tricyclene e β -felandreno) e reduziu (E)- β -ocimeno (HUBER et al., 2005). Promoveu ainda, a emissão dos monoterpenos (Z)-3-hexenil acetato, (E)- β -ocimeno e (E)-4,8,-dimetil-1, 3,7 nonatrieno (HARE, 2007).

Aumentou os diterpenos abietate, levopimarate, palustrate e sandaracopimarate (HUBER et al., 2005) e tanshinona (LIANG et al., 2012), bem como os triterpenos esqualeno e olean-12-en-3-one (WANG et al., 2010). Aumentou a saponina triterpênica ginsenosídeo em raízes de ginseng (KIM et al., 2004; ALI et al., 2006; KIM et al., 2009), bem como a expressão de genes envolvidos na sua biossíntese (CHOI et al., 2005; KIM et al., 2009).

Segundo Liang et al. (2012), a produção aumentada do diterpeno tanshinona em função da aplicação do jasmonato de metila é mediada pela indução de ROS.

A aplicação de MeJA promoveu aumento nos sesquiterpenos α -humuleno, germacreno D, longifolene e (E)-cariofileno (HUBER et al., 2005) e (E)- β -cariofileno, α -bergamoteno, α -humuleno, β -selineno e (E, E)-4,8,12-trimetil-1, 3,7,11 tridecatetraeno (HARE, 2007). Diversos estudos comprovam que o MeJA é um potente indutor do sesquiterpeno lactonizado artemisinina ou de seus potenciais precursores, como o ácido diidroartemisinico, ácido metil artemisinínico e diidroartemisinina (WANG et al., 2010; AFTAB et al., 2011).

As espécies de gimnospermas são muito influenciadas pelo tratamento com MeJA, o que significa que esse composto pode oferecer proteção potencial contra herbívoros nas espécies desse grupo (MARTIN et al., 2002; MARTIN; GERSHENZON; BOHLMANN, 2003; HEIJARI et al., 2005; ZULAK et al., 2010). Estimula a produção de geranylgeranil pirofosfato sintase, bem como

aumenta a síntese de monoterpenos e diterpenos no tecido da madeira (MARTIN et al., 2002). Diversas enzimas monoterpeno sintase e diterpeno sintase e seus produtos são induzidos pelo tratamento com MeJA (ZULAK et al., 2010).

Aumenta o acúmulo de monoterpeno e sesquiterpeno e a emissão de terpeno total nas folhas (MARTIN; GERSHENZON; BOHLMANN, 2003). Neste trabalho a composição dos terpenos voláteis emitidos foi muito alterada com a aplicação de MeJA, sendo que o sesquiterpeno (E)- β -farneseno aumentou mais de 100 vezes e os monoterpenos oxigenados (linalol e 1,8-cineol) apresentaram a maior proporção de aumento, representando quase 40% dos monoterpenos totais emitidos. Aumenta ainda, a produção de resina terpenoide e de monoterpenos, com maior concentração de α -pineno (HEIJARI et al., 2005).

A aplicação de MeJA aumenta o teor do alcaloide piridínico nicotina, bem como induz a expressão de uma série de genes envolvidos na sua biossíntese, envolvendo múltiplos mecanismos de regulação (IMANISHI et al., 1998). Aumenta ainda, o acúmulo dos alcaloides benzofenantridine diidrosanguinarina e sanguinarina (CHO et al., 2008), tropânicos como tropinona, ϕ tropina e tropina (DENG, 2005) e indólicos, tais como ajmalicina, serpentina, catarantina e ajmalina (RUIZ-MAY et al., 2009) e reserpina (HARISARANRAJ; SURESH; BABU, 2009).

3 OBJETIVOS

Avaliar a eficiência eliciadora do jasmonato de metila e da quitosana sobre os metabolismos antioxidante e fenólicos, as trocas gasosas e a anatomia foliar de *Piper mollicomum*, no sentido de adequar o sistema produtivo para aumento da produção e da qualidade do seu óleo essencial.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M. R. et al. Growth and yield Responses of strawberry plants to Chitosan application. **European Journal of Scientific Research**, Seychelles, v. 39, n. 1, p. 170-177, Jan. 2010.

AFTAB, T. et al. role of salicylic acid in promoting salt stress tolerance and enhanced artemisinin production in *Artemisia annua* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, n. 4, p. 425 - 435, Dec. 2011.

AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 73-90, Feb. 2012.

ALI, M. B. et al. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 613-620, June 2006.

ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. CO₂-induced total phenolics in suspension cultures of *Panax ginseng* C. A. Mayer roots: role of antioxidants and enzymes. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 43, p. 449-457, 2005.

ALLAN, C.; HADWIGER, L. A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 3, n. 3, p. 285-287, Sept. 1979.

ALMAGRO, L. et al. Early signaling network in tobacco cells elicited with methyl jasmonate and cyclodextrins. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 51, p. 1-9, 2012.

ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; MELO-DE-PINNA, G. F. A. Morphology and anatomy of a leaf mine in *Vismia guianensis* (Aubl.) choisy (Clusiaceae) in a fragment of Brazilian Atlantic forest. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, n. 2B, p. 759-763, May 2006.

ANDI, S. et al. Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured BY-2 cells. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 446-449, Apr. 2001.

ANJUM, S. A. et al. Effect of exogenous methyl jasmonate on growth, gas exchange and chlorophyll contents of soybean subjected to drought. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 10, n. 47, p. 9640-9646, Aug. 2011.

APEL, K; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, June 2004.

ARORA, A. et al. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 373, n. 1, p. 102-109, Jan. 2000.

ARZOLLA, F. A. R. D. P. et al. Regeneração natural em clareiras de origem antrópica na Serra da Cantareira, SP. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 155-169, 2010.

BALBI, V.; DEVOTO, A. Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. **New Phytologist**, Cambridge, v. 177, n. 2, p. 301-318, Jan. 2008.

BAQUE, M. A. et al. Elicitor effect of chitosan and pectin on the biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* L. **Australian Journal of Crop Science**, Austrália, v. 6, n. 9, p. 1349-1355, Sept. 2012.

BARDELLI, K. C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A. V. G. de. O gênero *Piper* L. (*Piperaceae*) da Mata Atlântica da Microbacia do sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 553- 561, abr. 2008.

BELCHÍ-NAVARRO, S. et al. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 81-89, Jan. 2012.

BHATTACHARJEE, S. The language of reactive oxygen species signaling in plants. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1-22, 2012.

BITTELLI, M. et al. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 167-1752, Apr. 2001.

BOONLERTNIRUN, S.; BOONRAUNG, C.; SUVANASARA, R. Application of chitosan in rice production. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, Cambridge, v. 18, n. 2, p. 47-52, 2008.

BOUGHTON, A. J.; HOOVER, K.; FELTON, G. W. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, p. 2211-2216, 2005.

BRITO M. R. de; SENNA-VALLE, L. de. Plantas medicinais utilizadas na comunidade Caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 363-372, Apr./June 2011.

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

BULGAKOV, V. P. et al. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 213-221, Aug. 2002.

BULGAKOV, V. P. et al. The rolB and rolC genes activate synthesis of anthraquinones in *Rubia cordifolia* cells by mechanism independent of octadecanoid signaling pathway. **Plant Science**, Limerick, v. 166, p. 1069-1075, 2004.

CARVALHO-OKANO, R. M. de; ALVES, S. A. M.. *Piperaceae* C. Agardh da estação experimental Mata do Paraíso, Viçosa, MG. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 12, n. 3, p. 497-513, 1998. Suplemento.

CHAICHANA, N. et al. Response of stemona alkaloid production in stemona sp. to chitosan and yeast extract elicitors. **Current Research Journal of Biological Sciences**, Thailand, v. 4, n. 4, p. 449-454, July 2012.

CHAKRABORTY, M; KARUN, A; MITRA, A. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166, n. 1, p. 63-71, Jan. 2009.

CHANDÍA, N. P.; MATSUHIRO, B. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 42, n. 3, p. 235-240, Apr. 2008.

CHANG, J. H.; SHIN, J. H.; CHUNG, I. S. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, n. 12, p. 1097-1099, Dec. 1998.

CHEN, H. P.; XU, L. L. Isolation and characterization of a novel chitosan-binding protein from non-heading chinese cabbage leaves. **Journal of Integrative Plant Biology**, Ney York, v. 47, n. 4, p. 452-456, Apr. 2005.

CHENG, X. Y. et al. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 253-260, Jan. 2006.

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

CHINI, A. et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling. **Nature**, London, v. 448, n. 7154, p. 666-671, Aug. 2007.

CHIRKOV, S. N. The antiviral activity of chitosan. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 38, n. 1, p. 5-13, 2002.

CHO, H. Y. et al. Differential induction of protein expression and benzophenanthridine alkaloid accumulation in *eschscholtzia californica* suspension cultures by methyl jasmonate and yeast extract. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 255-262, Feb. 2008.

CHOI, D. W. et al. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 8, p. 557-566, Jan. 2005.

COMPAROT, S. M.; GRAHAM, C. M.; REID, D. M. Methyl jasmonate elicits a differential antioxidant response in light- and dark-grown canola (*Brassica napus*) roots and shoots. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 38, n. 1, p. 21-30, Sept. 2002.

CONRATH, U.; DOMARD, A.; KAUSS, H. Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, n. 3, p. 152-155, 1989.

CORDOVA, S. M. de. et al. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p. 241-244, out./dez. 2010.

CORRÊA, M. P.; PENA, L. de A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**: volume 1. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

CORRÊA, M. P.; PENA, L. de A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**: volume 3. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

CORRÊA, M. P.; PENA, L. de A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**: volume 5. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

CORRÊA, P. G. et al. Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 3, p. 54-57, set. 2008.

CROTEAU, R. et al. Biochemistry of oleoresinosis: monoterpene and diterpene biosynthesis in lodgepole pine saplings infected with *Ceratocystis clavigera* or treated with carbohydrate elicitors. **Plant Physiology**, Washington, v. 85, n. 4, p. 1123-1128, Dec. 1987.

DEL AMOR, F. M.; CUADRA-CRESPO, P. Alleviation of salinity stress in broccoli using foliar urea or methyl-jasmonate: analysis of growth, gas exchange, and isotope composition. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 63, p. 55-62, Dec. 2011.

DEMIDCHIK, V. Reactive oxygen species, oxidative stress and plant Ion Channels. **Signaling and Communication in Plants**, Essex, v. 135, n. 2, p. 207-232, 2010.

DEMOLE, E.; LEDERER, E.; MEREIER, D. Isolement et determination de la structure du jasmonate de methyle, constituant odorant caracteristique de essence de jasmin. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 45, n. 2, p. 675-685, Oct. 1962.

DENG, F. Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 82, n. 1, p. 16-26, May 2005.

DESCHAMPS, C.; SIMON, J. E. Terpenoid essential oil metabolism in Basil (*Ocimum basilicum* L.) following elicitation. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 18, n. 6, p. 618-621, Nov./Dec. 2006.

DESIKAN, R. et al. Regulation of the arabidopsis transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, n. 1, p. 159-172, Sept. 2001.

DOARES, S. H. et al. Oligogalacturonoids and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, n. 10, p. 4095-4098, 1995.

DUARTE, M. C. T. et al. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec Escherichia coli. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, nesp., p. 139- 143, 2006.

DURANGO, D.; et al. Phytoalexin Accumulation in Colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. **Molecules**, Basel, v. 7, n. 11, p. 817 - 832, 2002.

EL HADRAMI, A. et al. Chitosan in plant protection. **Marine Drugs**, Morocco, v. 8, n. 4, p. 968-987, Mar. 2010.

EL-TANAHY, A. et al. Effect of Chitosan Doses and Nitrogen Sources on the Growth, Yield and Seed Quality of Cowpea. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Fuchu, v. 6, n. 4, p. 115-121, 2012.

EL-TANTAWY, E. M. Behavior of tomato plants as affected by spraying with chitosan and aminofort as natural stimulator substances under application of soil organic amendments. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Egypt, v. 12, n. 17, p. 1164-1173, 2009.

FAN, G. et al. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 9, n. 19, p. 2816-2820, May 2010.

FAORO, F. et al. Chitosan-elicited resistance to plant viruses: a histochemical and cytochemical study. In: MUZZARELLI, R. A. A. (Ed.). **Chitin enzymology**. Italy: Atec, 2001. p. 57-62.

FARMER, E. E. Jasmonate perception machines. **Nature**, London, v. 448, n. 7154, p. 659-660, Aug. 2007.

FAROUK, S.; OSMAN, M. A. The effect of plant defense elicitors on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield in absence or presence of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) infestation. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, Michigan, v. 7, n. 3, p. 05- 22, 2011.

FRANCESCHI, V. R.; GRIMES, H. D. Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate (signal transduction/hormones/ intracellular messengers/nitrogen partitioning). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, n. 15, p. 6745 - 6749, 1991.

FRANCESCHI, V. R.; KREKLING, T.; CHRISTIANSEN, E. Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense-related responses in phloem and xylem. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 89, n. 4, p. 578-586, Apr. 2002.

GALIS, I. et al. A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. **The Plant Journal**, New York, v. 46, n. 4, p. 573-592, May 2006.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, Itália, v. 143, n. 1, p. 81-96, Mar. 2009.

GARRIDO, I. et al. Redox-related peroxidative responses evoked by methyljasmonate in axenically cultured aeroponic sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedling roots. **Protoplasma**, New York, v. 221, n. 1-2, p. 79- 91, May 2003.

GEHRING, C. A. et al. Jasmonates induce intracellular alkalization and closure of Paphiopedilum guard cells. **Annals of Botany**, London, v. 80, p. 485-489, May 1997.

GHONAME, A. A. et al. Enhancement of sweet pepper crop growth and production by application of biological, organic and nutritional solutions. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Cairo, v. 6, n. 3, p. 349-355, 2010.

GLAS, J. J. et al. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, Bethesda, v. 13, n. 12, p. 17077-17103, Dec. 2012.

GONUGUNTA, V. K.; SRIVASTAVA, N.; RAGHAVENDRA, A. S. Cytosolic alkalization is a common and early messenger preceding the production of ROS and NO during stomatal closure by variable signals, including abscisic acid, methyl jasmonate and chitosan. **Plant Signaling and Behavior**, Health, v. 4, n. 6, p. 561-564, 2009.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. *Piperaceae* do nordeste brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 1, p. 21-46, 2004.

GUIMARÃES, E. F.; MONTEIRO, D. *Piperaceae* na reserva biológica de poço das antas, silva jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 3, p. 567-587, 2006.

HAFDANI, F. N.; SADEGHINIA, N. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, Oxford, v. 50, p. 252-256, 2011.

HARE, J. D. Variation in herbivore and methyl jasmonate-induced volatiles among genetic lines of datura wrightii. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 11, p. 2028-2043, Nov. 2007.

HARISARANRAJ, R.; SURESH, K.; S. BABU, S. Production of Reserpine in Somatic Embryos of *Rauwolfia serpentina* Cultured in Bioreactors by the Induction of Elicitor (Methyl Jasmonate). **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, India, v. 4, n. 2, p. 143 - 147, July/Dec. 2009.

HARMS, K.; RAMIREZ, I.; PEÑA-CORTÉS, H. Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. **Plant Physiology**, Washington, v. 118, n. 3, p. 1057-1065, Nov. 1998.

HEIJARI, J. et al. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 117-124, 2005.

HORBOWICZ, M. et al. Effects of methyl jasmonate on accumulation of flavonoids in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Acta Biologica Hungarica**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 265-78, Sept. 2011.

HOSSAIN, M. A. et al. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in arabidopsis. **Plant Physiology**, Washington, v. 156, n. 1, p. 430-438, May 2011.

HOWE, G. A. et al. Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato: cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. **Plant Physiology**, Washington, v. 123, n. 2, p. 711-724, June 2000.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Reviews of Plant Biology**, Michigan, v. 59, p. 41-66, June 2008.

HUBER, D. P. W. et al. Changes in anatomy and terpene chemistry in roots of Douglas-fir seedlings following treatment with methyl jasmonate. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, p. 1075-1083, June 2005.

HUDGINS, J. W.; CHRISTIANSEN, E.; FRANCESCHI, V. R. Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. **Tree Physiology**, Oxford, v. 24, p. 251-264, Jan. 2004.

HUDGINS, J. W.; CHRISTIANSEN, E.; FRANCESCHI, V. R. Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the Pinaceae. **Tree Physiology**, Oxford, v. 23, p. 361-371, Mar. 2003.

HUSSAIN, M. H. M.; ABDEEN, Z.; HIFNI, H. **Chitosans production byproducts as valuable material**: volume 5. Venice: European Chitin Society, 2009.

IMANISHI, S. et al. Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, p. 1101-1111, 1998.

IRITI, M. et al. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 66, p. 493-500, 2009.

IRITI, M.; FAORO, F. Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 46, n. 12, p. 1106-1111, 2008.

IRITI, M.; FAORO, F. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. **Plant Signaling and Behavior**, Milano, v. 4, n. 1, p. 66-68, Jan. 2007.

ISHIGURO, S. et al. The defective in anther dehiscence 1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 10, p. 2191-209, Oct. 2001.

ISLAM, M. M. et al. Myrosinases, *tgg1* and *tgg2*, redundantly function in ABA and MeJA signaling in Arabidopsis guard cells. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 1171-1175, June 2009.

JARDIM, J. U. G. **Estudo fitoquímico das raízes de Piper mollicomum Kunth**. 2012. 174 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

JIN, J. H. et al. Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone colorants in Madder (*Rubia akane* Nakai) cell culture. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Oxford, v. 4, p. 300-304, 1999.

JUNG, S. Effect of chlorophyll reduction in Arabidopsis thaliana by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. **Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, Korea, v. 42, n. 3, p. 231-255, Apr. 2004.

KAHLOS, K.; KIVIRANTA, J. L. J.; HILTUNEN, R. V. K. Volatile constituents of wild and in vitro cultivated *Gloeophyllum odoratum*. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 36, n. 4, p. 917-922, July 1994.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, Austrália, v. 5, n. 6, p. 709-725, June 2011.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53 p. 299-328, June 2002.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, n. 8, p. 859-863, Aug. 2003.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 40, n. 4, p. 621- 624, Oct. 2002.

KHOKON, M. A. et al. Chitosan-induced stomatal closure accompanied by peroxidase-mediated reactive oxygen species production in Arabidopsis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 74, n. 11, p. 2313-2315, Nov. 2010.

KIM, H. J. et al. Effect of chitosan on the biological properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 9, p. 3696-3701, Sept. 2005.

KIM, H. J. et al. Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 12, p. 10366-10372, Dec. 2007.

KIM, H. J. et al. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 6, p. 2327-2332, June 2006.

KIM, J. H. et al. Effect of chitosan on indirubin production from suspension culture of *Polygonum tinctorium*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 83, n. 2, p. 206-208, 1997.

KIM, O. T. et al. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 4, p. 25-33, 2009.

KIM, Y. S. et al. Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 21, p. 1619-1622, Nov. 2004.

KOBAYASHI, H.; YANAKA, M.; IKEDA, T. M. Exogenous methyl jasmonate alters trichome density on leaf surfaces of rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth). **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 29, n. 4, p. 506-511, Dec. 2010.

KÖHLE, H.; YOUNG, D. H.; KAUSS, H. Physiological changes in suspension-cultured soybean cells elicited by treatment with chitosan. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 33, p. 221-230, 1984.

KORSANGRUANG, S. et al. Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 103, n. 3, p. 333 - 342, Dec. 2010.

KULIKOV, S. N. et al. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. **Prikladnaia Biokhimiia Mikrobiologiia**, Moskya, v. 42, n. 2, p. 224-228, Mar./Apr. 2006.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces Cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis Sativus*) contra *Colletotrichum Lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine Max*)**. 2002. 118 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

LAGO, J. H. G. et al. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (*Piperaceae*). **Quimica Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1222-1224, set./out. 2007.

LEE, S. L. et al. Oligogalaturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 121, n. 1, p. 147- 152, Sept. 1999.

LEE, Y. S.; KIM, Y. H.; KIM, S. B. Changes in the respiration, growth, and vitamin C content of soybean sprouts in response to chitosan of different molecular weights. **HortScience**, Alexandria, v. 40, n. 5, p. 1333-1335, Oct. 2005.

LEI, C. et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2011.

LEWINSOHN, E.; WORDEN, E.; CROTEAU, R. Monoterpene cyclase in grand fir callus cultures: modulation by elicitors and growth regulators. **Phytochemistry**: chemistry, biochemistry, molecular biology, New York, v. 36, n. 3, p. 651-656, June 1994.

LI, X. et al. Effects of salicylic acid (SA), ultraviolet radiation (UV-B and UV-C) on trans-resveratrol inducement in the skin of harvested grape berries. **Frontiers of Agriculture in China**, Verlage, v. 2, n. 1, p. 77-81, Jan. 2008.

LIANG, Z. S. et al. Roles of reactive oxygen species in methyl jasmonate and nitric oxide-induced tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 5, p. 873-883, May 2012.

LIU, C.; CHENG, X. Enhancement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in cell cultures of *Cistanche deserticola* by osmotic stress. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 2, p. 357-362, Feb. 2008.

LIU, H. et al. Molecular dissection of the pathogen-inducible 3-deoxyanthocyanidin biosynthesis pathway in sorghum. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 51, n. 7, p. 1173- 1185, July, 2010.

LIU, Y. et al. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by amitogen-activated protein kinase cascade. **The Plant Journal**, New York, v. 51, n. 6, p. 941-954, Dec. 2007a.

LIU, Y.; ZHAO, X.; LI, H. Inhibition of Methyl Jasmonate on Root Growth and Antioxidative Enzyme Activities in Wheat. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, China, v. 35; n. 4; p. 988-1006, Apr. 2007b.

LOCKWOOD, G. B. et al. Production of d-limonene in Chitosan elicited citrus Japonica suspension cultures. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, n. 2, p. 113-116, Mar./Apr. 2007.

MA, C. J. Cellulase elicitor induced accumulation of capsidiol in *Capsicum annum* L. suspension cultures. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 5, p. 961-965, May 2008.

MANDAL, S. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 9, n. 47, p. 8038-8047, Nov. 2010.

MANDAL, S.; MITRA, A. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 71, n. 4-6, p. 201-209, Oct./Dec. 2007.

MARTIN, D. M.; GERSHENZON, J.; BOHLMANN, J. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. **Plant Physiology**, Washington, v. 132, n. 3, p. 1586-1599, July 2003.

MARTIN, D. et al. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, n. 3, p. 1003-1018, July 2002.

MAUCHER, H. et al. Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. **The Plant Journal**, New York, v. 21, n. 2, p. 199-213, Jan. 2000.

MEDEIROS, M. F. T. et al. Informações estratégicas geradas através do estudo de patentes de plantas medicinais citadas pelos sítiantes da reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiania, v. 4, n. 2, p. 139-147, 2007.

MEDEIROS, M. F. T.; FONSECA, V. S. da; ANDREATA, R. H. P. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 391-399, Apr./June 2004.

MEDEIROS, M. F. T.; SENNA-VALLE, L. de; ANDREATA, R. H. P. **Flora medicinal dos sítiantes da reserva particular do patrimônio natural Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil: taxonomia e aspectos etnobotânicos**. Rio de Janeiro: UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

MEDINA-BOLIVAR, F. et al. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 68, n. 14, p. 1992-2003, Mar. 2007.

MELO, A. C. G. de; DURIGAN, G. Evolução estrutural de reflorestamentos de restauração de matas ciliares no Médio Vale do Paranapanema. **Scientia Forestalis**, São Paulo, n. 73, p. 101-111, mar. 2007.

MEYER, R.; RAUTENBACH, G. F.; DUBERY, I. A. Identification and quantification of methyl jasmonate in leaf volatiles of *Arabidopsis thaliana* using solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 14, n. 3, p. 155-159, May/June 2003.

MIZUKAMI, H.; TABIRA, Y.; ELLIS, B. E. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n. 12, p. 706-709, Oct. 1993.

MONDAL, M. M. A. et al. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. **Australian Journal of Crop Science**, Austrália, v. 6, n. 5, p. 918-921, May 2012.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medical plants of Brazil**. Rio de Janeiro: Laemmert, 2000.

MULLET, J. E.; MASON, H. S. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 6, p. 569-579, June 1990.

MUNEMASA, S. et al. The arabidopsis calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 155, n. 1, p. 553-561, Jan. 2011.

MUNEMASA, S. et al. The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in Arabidopsis guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. **Plant Physiology**, Washington, v. 143, n. 3, p. 1398-1407, Mar. 2007.

MUZZARELLI, R. A. A. Some modified chitosans and their niche applications. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. **Chitin handbook**. Italy: Atec, 1997. p. 47-52.

NAGORSKAYA, V. P. et al. Effect of chitosan on the cell ultrastructure and activity of hydrolases in tobacco leaves. **Biochemistry**, Washington, v. 54, n. 12, p. 911- 915, Dec. 2012.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy Review**, Erandwane, v. 1, n. 1, p. 69-79, Jan./May 2007.

NAOUMKINA, M. et al. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 46, p. 17909-17915, 2007.

NEILL, S. et al. Nitric oxide, stomatal closure and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 165-176, Feb. 2008.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, Bristol, v. 5, n. 5, p. 388-395, Oct. 2002.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Simultaneous measurement of foliar glutathione, γ -glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 264, n. 3, p. 98-110, 1998.

OHTA, K. et al. Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. **HortScience**, Alexandria, v. 34, n. 2, p. 233-234, Apr. 1999.

OLSEN, K. M. et al. Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 14, p. 1491-1499, Sept. 2008.

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

OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, n. 11, p. 6553-6557, 1999.

PARRA-LOBATO, M. C. et al. Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 66, p. 9-17, 2009.

PECKOLT, T.; PECKOLT, G. **Histórias das plantas medicinaes e úteis do Brazil**. Rio de Janeiro: Laemmert, 1888.

PENEDO, P. L. M. **Estudo sobre a potencialidade da extração de produtos naturais utilizando CO₂ supercrítico**. 2007. 126 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PITTA-ALVAREZ, S. I.; GIULIETTI, A. M. Influence of chitosan, acetic acid and citric acid on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of *Brugmansia candida*: Effect of medium pH and growth phase. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 59, n. 1, p. 31-38, Jan. 1999.

POSPIESZNY, H.; CHIRKOV, S.; ATABEKOV, J. Induction of antiviral resistance in plants by chitosan. **Plant Science**, Limerick, v. 79, n. 1, p. 63-68, 1991.

PUTALUN, W. et al. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, n. 7, p. 1143-1146, Mar. 2007.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 3, p. 1457-1465, 2003.

RAHMAN, M.; PUNJA, Z. K. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 43, n. 12, p. 1103-1114, 2005.

RANGEL, M. et al. Accumulation of chloroplast-targeted lipoxygenase in passion fruit leaves in response to methyl jasmonate. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 60, n. 6, p. 619-625, July 2002.

REDDY, M. V. B. et al. Chitosan effects on blackmold rot and pathogenic factors produced by *Alternaria alternata* in postharvest tomatoes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Washington, v. 125, n. 6, p. 742-747, July 2000.

REIGADA, J. B. **Bioprospecção em espécies de Piperaceae**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003.

ROHWER, C. L.; ERWIN, J. E. Horticultural applications of jasmonates: A review. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 83, n. 3, p. 283 - 304, June 2008.

ROMANAZZI, G. et al. Effects of pre-and postharvest chitosan treatments to control storage gray mold of table grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1862-1867, 2002.

ROSSARD, S. et al. Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1245-1252, Mar. 2006.

ROSSATO, L. et al. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 371, p. 1131-1141, May 2002.

RUIZ-MAY, E. et al. Methyl jasmonate induces ATP biosynthesis deficiency and accumulation of proteins related to secondary metabolism in *Catharanthus roseus* (L.) G. hairy roots. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 52, n. 8, p. 1401-1421, June 2011.

RUIZ-MAY, E.; GALAZ-AVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Differential Secretion and Accumulation of Terpene Indole Alkaloids in Hairy Roots of *Catharanthus roseus* Treated with Methyl Jasmonate. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 41, n. 3, p. 278-285, Mar. 2009.

RUSCHEL, D. **O gênero Piper (Piperaceae) no Rio Grande do Sul**. 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SAITO, N. et al. Roles of RCN1, regulatory a subunit of protein phosphatase 2A, in methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 49, n. 9, p. 1396-1401, July 2008.

SAMUILOV, V. D. et al. Programmed cell death in plants: Protective effect of phenolic compounds against chitosan and H₂O₂. **Biochemistry**, Moscow, v. 75, n. 2, p. 257-263, Feb. 2010.

SANTOS, P. R. D. dos. et al. Essential oil analysis of 10 *Piperaceae* species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 58, n. 4, p. 547-551, 2001.

SANZ, L. C. et al. Effect of methyl jasmonate on ethylene synthesis and stomatal closure in olive leaves. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 33, p. 285-289, 1993.

SASAKI, Y. et al. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **DNA Research**, Tokyo, v. 8, p. 153-161, July 2001.

SAVARD, T. et al. Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 5, p. 828-833, May 2002.

SEDIGHEH, E. B. et al. Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan in linum album cell culture. **Iranian Journal of Plant Biology Springer**, Isfahan, v. 4, n. 11, p. 13-25, 2012.

SEE, K. S.; BHATT, A.; KENG, C. L. Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastoma malabathricum* (Melastomaceae). **Revista de Biología Tropical**, San Jose, v. 59, n. 2, p. 597-606, July 2011.

SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. The biochemistry and physiological and molecular actions of jasmonates. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 44, p. 569-589, June 1993.

SEO, H. S. et al. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 8, p. 4788-4793, Apr. 2001.

SEVÓN, N.; HILTUNEN, R.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Chitosan increases hyoscyamine content in hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus*. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 96-99, May 1992.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHEHATA, S. A.; FAWZY, Z. F.; EL-RAMADY, H. R. Response of cucumber plants to foliar application of chitosan and yeast under greenhouse conditions. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Fuchu, v. 6, n. 4, p. 63-71, 2012.

SHEIKHA, S. A. A. K.; AL-MALKI, F. M. Growth and Chlorophyll Responses of Bean Plants to the Chitosan Applications. **European Journal of Scientific Research**, Seychelles, v. 50, n. 1, p. 124-134, Feb. 2011.

SHINDE, A. N.; MALPATHAK, N.; DEVANAND, P. F. Enhanced production of phytoestrogenic isoflavones from hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Oxford, v. 14, p. 288- 294, 2009.

SHOHAEL A. M. et al. Methyl jasmonate induced overproduction of eleutherosides in somatic embryos of *Eleutherococcus senticosus* cultured in bioreactors. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 10, n. 4, p. 633-637, Oct. 2007.

SIRCAR, D. et al. Alternative oxidase (AOX) and phenolic metabolism in methyl jasmonate-treated hairy root cultures of *Daucus carota* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 7, p. 657-663, July 2012.

SIRCAR, D.; MITRA, A. Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota* 2: Confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166, n. 13, p. 1370-1380, Aug. 2009.

SIRCAR D.; MITRA A. Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 4, p. 407-414, Apr. 2008.

SIVASANKAR, S.; SHELDRIK, B.; ROTHSTEIN, S. J. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, n. 4, p. 1335-1342, Apr. 2000.

SLESACK, E.; SLESACK, M.; GABRYS, B. Effect of methyl jasmonate on hydroxamic acid content, protease activity, and bird cherry–oat aphid *Rhopalosiphum padi* L. probing behavior. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, n. 12, p. 2529-2543, Dec. 2001.

SOARES, A. M. dos et al. Effect of methyl jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. **Brazilian Society of Plant Physiology**, Califórnia, v. 22, n. 158, p. 151-158, Sept. 2010.

SONG, J. T. et al. NTR1 encodes a floral nectary-specific gene in *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, n. 4, p. 647-55, Apr. 2000.

SRIVASTAVA, N. et al. Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. **Planta**, Hyderabad, v. 229, n. 4, p. 757-765, Mar. 2009.

STASWICK, P. E. JAZing up jasmonate signaling. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 66-71, Feb. 2008.

STASWICK, P. E.; SU, W. P.; HOWELL, S. H. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 89, n. 5, p. 6837-6840, Aug. 1992.

STENZEL, I. et al. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato: amplification in wound signaling. **The Plant Journal**, New York, v. 33, n. 5, p. 577-589, Sept. 2003.

STINTZI, A.; BROWSE, J. The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, n. 19, p. 10625-10630, July 2000.

SUHITA, D. et al. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, n. 4, p. 1536-1545, Apr. 2004.

TASSONI, A.; DURANTE, L.; FERRI, M. Combined elicitation of methyl-jasmonate and red light on stilbene and anthocyanin biosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 8, p. 775-781, May 2012.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 1-13, Mar. 2004.

THAWEESAK, J. et al. Elicitation effect on production of plumbagin in in vitro culture of *Drosera indica* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, Germany, v. 5, n. 19, p. 4949-4953, 2011.

THINES, B. et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signaling. **Nature**, London, v. 448, n. 7154, p. 661-665, Aug. 2007.

TOCCI, N. et al. A three-step culture system to increase the xanthone production and antifungal activity of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* in vitro roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 57, p. 54-58, Aug. 2012.

TOCCI, N. et al. Chitosan enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* cell cultures. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 24, n. 3, p. 286-293, Oct. 2010.

TORRES, M. A.; JONES, J. D. G.; DANG, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant Physiology**, Washington, v. 141, n. 1, p. 373-378, Jan. 2006.

TURNER, J. G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 153-164, 2002. Suplemento.

UDDIN, A. F. M. J. et al. Monosaccharides and chitosan sensing in bud growth and petal pigmentation in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 100, p. 127-138, 2004.

UDOMSUK, L. et al. Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, n. 2, p. 369-374, Feb. 2011.

UTHAIRATANAKIJ, A.; SILVA, J. A. T. da; OBSUWAN, K. Chitosan for improving orchid production and quality. **Orchid Science and Biotechnology**, Cheng Kung, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2007.

UTSUNOMIYA, N.; KINAI, H. Effect of chitosan-oligosaccharides soil conditioner on the growth of passionfruit. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tsukuba, v. 67, n. 4, p. 567-571, July 1998.

VALLE, R. de C. S. C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**. 2003. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VANHOLME, R. et al. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, Washington, v. 153, n. 3, p. 895-905, July 2010.

VASCONSUELO, A. A. et al. Involvement of the PLC/PKC pathway in Chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 2, p. 429-436, 2003.

VASCONSUELO, A. et al. Intracellular calcium mobilization: A key step for chitosan-induced anthraquinone production in *Rubia tinctorum* L. **Plant Science**, Limerick, v. 169, n. 4, p. 712-720, 2005.

VASCONSUELO, A.; GIULIETTI, A. M.; BOLAND, R. Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*. **Plant Science**, Limerick, v. 166, n. 2, p. 405–413, 2004.

VASIL'EV, L. A. et al. Chitosan-induced programmed cell death in plants. **Biochemistry**, Moscow, v. 74, n. 9, p. 1035–1043, Sept. 2009.

VERGARA, A. G. et al. Señalización del ácido jasmónico y el óxido nítrico durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. **Ciencia Nicolaita**, Essex, n. 55, p. 28-41, 2012.

VEZZULLI, S. et al. Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 58, n. 4, p. 530-533, Dec. 2007.

WALKER-SIMMONS, M. et al. Comparison of proteinase inhibitor-inducing activities and phytoalexin elicitor activities of a pure fungal endopolygalacturonase, pectic fragments, and chitosans. **Plant Physiology**, Washington, v. 76, n. 3, p. 833-836, Nov. 1984.

WANG, H. H. et al. Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 31, p. 214–218, 2010.

WANICHPONGPAN, P.; SURIYACHAN, K.; CHANDRKRACHANG, S. Effects of chitosan on the growth of Gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*). In: URAGAMI, T.; KURITA, K.; FUKAMIZO, T. (Ed.). **Chitin and chitosan in life science**. Tokyo: Kodansha Scientific, 2001, p. 198–201.

WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 4, p. 681-697, Oct. 2007.

WASTERACK, C.; PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 8, p. 302-307, Aug. 1997.

WASTERACK, C.; XIE, D. The genuine ligand of a jasmonic acid receptor Improved analysis of jasmonates is now required. **Plant Signaling & Behavior**, Germany, v. 5, n. 4, p. 337-340, Apr. 2010.

WILLEKENS, H. et al. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 16, p. 4806-4816, Aug. 1997.

WU, J.; WANG, L.; BALDWIN, I. T. Methyl jasmonate-elicited herbivore resistance: does MeJA function as a signal without being hydrolyzed to JA? **Planta**, Hyderabad, v. 227, n. 5, p. 1161-1168, Apr. 2008.

XIAO, Y. et al. Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 137, n. 1, p. 1-9, Sept. 2009.

XU, F. et al. Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from Ginkgo biloba. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 7, n. 6, p. 721-729, Mar. 2008.

XU, Q. J. M. et al. Effects of chitosan on growth of an aquatic plant (*Hydrilla verticillata*) in polluted waters with different chemical oxygen demands. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 19, p. 217-221, 2007.

YAN, J. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. **Plant, Cell and Environment**, Minneapolis, v. 30, n. 10, p. 1320-1325, Oct. 2007.

YAN, J. et al. The Arabidopsis Coronatine Insensitive1 protein is a jasmonate receptor. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 8, p. 2220-2236, Aug. 2009.

YU, O.; MCGONIGLE, B. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 86, p. 147–190, 2005.

ZENG, D.; LUO, X. Physiological Effects of Chitosan Coating on Wheat Growth and Activities of Protective Enzyme with Drought Tolerance. **Open Journal of Soil Science**, Wuhan, v. 2, n. 3, p. 282-288, Sept. 2012.

ZHANG, C. H. et al. Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1561-1564, Aug. 2000.

ZHANG, C. H. et al. Enhanced paclitaxel productivity and release capacity of *Taxus chinensis* cell suspension cultures adapted to chitosan. **Plant Science**, Limerick, v. 172, n. 1, p. 158-163, Jan. 2007.

ZHANG, L.; XING, D. Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent. **Plant and Cell Physiology**, Okayama, v. 49, n. 7, p. 1092-1111, July 2008.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 23, n. 4, p. 283–333, June 2005.

ZHAO, T. et al. The influence of *Ceratocystis polonica* inoculation and methyl jasmonate application on terpene chemistry of Norway spruce, *Picea abies*. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 71, p. 1332–1341, June 2010.

ZULAK, K. G. et al. Immunofluorescence localization of levopimaradiene/abietadiene synthase in methyl jasmonate treated stems of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) shows activation of diterpenoid biosynthesis in cortical and developing traumatic resin ducts. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 71, n. 14-15, p. 1695-1699, 2010.

**CAPÍTULO 2 Interferência de eliciadores no metabolismo de antioxidantes
e fenólicos em folhas de *Piper mollicomum* Kunth**

1 INTRODUÇÃO

Dentre as *Piperaceae*, *Piper mollicomum*, conhecida popularmente como jaborandi, que embora ainda não seja cultivada comercialmente, possui elevado potencial devido suas propriedades medicinais. Possui ação comprovada como antibacteriana (CORDOVA et al., 2010) e antifúngica (LAGO et al., 2007; REIGADA, 2009) e é bastante utilizada na medicina popular para diversos fins (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; MEDEIROS et al., 2007; BRITO; SENNA-VALLE, 2011). É produtora de óleo essencial de elevado rendimento e moderada ação antibacteriana (DUARTE et al., 2006), destacando-se em sua composição monoterpenos e sesquiterpenos (PENEDO, 2007; SANTOS et al., 2001).

Durante o seu desenvolvimento, as plantas são expostas constantemente a diversas situações estressantes de natureza biótica (insetos, vírus, bactérias e fungos) ou abiótica (radiação ultravioleta, salinidade, temperatura, umidade, metais pesados, dentre outros). Quitosana e jasmonato de metila se destacam como compostos sinalizadores de respostas de defesa sistêmica na interação entre a planta e o patógeno.

Quitosana é um biopolímero hidrofílico formado por moléculas de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (RABEA et al., 2003). É o elemento estrutural do exoesqueleto de insetos e crustáceos (MUZZARELLI, 1997) e encontrado nas paredes celulares de uma variedade de fungos (BITTELLI et al., 2001). A quitosana é liberada pela ação de enzimas das plantas em paredes celulares microbianas (NAMDEO, 2007) e o mecanismo de ação envolve a sua ligação a receptores presentes na membrana celular (CHEN; XU, 2005).

O jasmonato de metila (MeJA) é o metil éster do fito-hormônio ácido jasmônico e caracteriza-se por conter um anel de ciclopentanona com uma

cadeia pentenil inserida no C7, um grupo carbonila no C6 e um acetil metilado no C3 (WASTERNAK; PARTHIER, 1997). Sua biossíntese ocorre pela via do ácido linoleico, pela rota octadecanoide durante a fragmentação da membrana plasmática (SASAKI et al., 2001; HOWE; JANDER, 2008). É produzido em resposta aos ferimentos causados por herbívoros e patógenos especialmente os necrotróficos (BROWSE, 2009).

Na interação patógeno-planta, uma das primeiras respostas celulares é a explosão oxidativa, resultante da produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005; SHARMA et al., 2012). A explosão oxidativa causada principalmente pela produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e anião superóxido (O_2^-) pode ser desencadeada pela quitosana (ROSSARD et al., 2006; LEI et al., 2011) e MeJA (PARRA-LOBATO et al., 2009; AFTAB et al., 2011).

O nível de ROS ou o estado redox da célula determinam o tipo de resposta, enquanto que a alta concentração inicia a peroxidação lipídica que culmina na morte celular, a baixas concentrações, induz genes de defesa e respostas adaptativas, como a síntese de lignina (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; BHATTACHARJEE, 2012). Eliminação ou desintoxicação das ROS em excesso é conseguida por um eficiente sistema antioxidante que compreende os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012).

Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e guaiacol peroxidase (GPX), bem como as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa [peroxidase do ascorbato (APX), redutase monodeidroascorbato (MDHAR), redutase deidroascorbato (Dhar) e glutaciona redutase (GR)], enquanto que os não enzimáticos compreendem os compostos ascorbato, glutaciona, carotenoides, tocoferóis e fenólicos (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012).

Objetivou-se com este estudo, avaliar a influência de diferentes concentrações de quitosana e jasmonato de metila no metabolismo de antioxidantes (teor de H_2O_2 , atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX e peroxidação lipídica) e fenólicos (atividade da primeira enzima da rota, a fenilalanina amonia liase e o teor de fenólicos total e lignina) em folhas em desenvolvimento e completamente expandidas de *Piper mollicomum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Etapa 1 - Obtenção das mudas

As mudas foram obtidas no Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA. Sementes de *P. mollicomum* foram pré-germinadas em placas de petri sobre três folhas de papel de filtro e mantidas em câmara de germinação do tipo *Mangesdorf* a 25 °C, durante 30 dias. As plântulas foram transferidas para bandejas de polipropileno expandido de 72 células, contendo substrato organomineral e mantidas em sala de crescimento por 60 dias para o estabelecimento da muda. A sala de crescimento foi programada para apresentar um fotoperíodo de 12 h, radiação incidente de 300 μmol de quanta. m^{-2} . s^{-1} , umidade relativa ao redor de 60% e regime térmico de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após esse período, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de 6 L de substrato (terra de subsolo, areia e esterco bovino, na proporção de 2:1:1) e mantidas em casa de vegetação por 4 meses, sob 50% de sombreamento, utilizando telas pretas, até a submissão dos tratamentos com eliciadores, momento em que as plantas atingiram o florescimento.

Etapa 2 - Elicitação

A quitosana utilizada possui 85% de desacetilação e apresenta fórmula molecular $(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$. As concentrações foram de 2,5; 5 e 10 g L^{-1} , cujas soluções foram preparadas, conforme metodologia descrita por Di Piero e Garda (2008), pela dissolução em ácido clorídrico a 0,05 N com agitação constante e correção do pH para 5,5 com hidróxido de sódio. Como controle foi utilizado plantas não pulverizadas e plantas pulverizadas apenas com o solvente. Em cada

planta foram pulverizadas 200 mL da solução de quitosana, em toda a parte aérea.

O jasmonato de metila foi utilizado nas concentrações de 0,5; 2,0 e 8 mM, preparada solubilizando-se o produto comercial em *Tween* 20 a 0,1%, conforme Hare (2007). Como controle foram utilizadas plantas não submetidas à aplicação de jasmonato de metila e plantas pulverizadas apenas com o solvente. Em cada planta foram pulverizadas 100 mL das soluções, de maneira a umedecer completamente toda a parte aérea, inclusive ambas as superfícies foliares.

Etapa 3 - Obtenção das variáveis

Foram analisadas três plantas por tratamento. De cada planta foi analisada uma folha em desenvolvimento localizada no segundo nó a partir do ápice e uma folha completamente expandida inserida no terceiro ou quarto nó. A coleta foi efetuada entre 8 e 10 h, retirando-se fragmentos da região mediana do limbo foliar, descartando-se a nervura central, acondicionando-os em tubos falcon, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *Freezer Forma Scientific* (model 925), a -86 °C, até o momento do preparo do extrato proteico, para a avaliação das atividades enzimáticas.

O extrato proteico foi obtido conforme metodologia proposta por Carneiro et al. (2011), com pequenos ajustes de protocolo. Foi realizada uma extração a frio com cerca de 70 mg de tecido foliar pulverizado em cadinho com nitrogênio líquido e posteriormente depositados em *ependorf* acrescentando-se 1,5 mL do tampão de extração contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 0,1 mM de EDTA e 10 mM de ácido ascórbico. O extrato foi centrifugado a 13000 g por 10 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado a -20 °C durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados

foram utilizados nas análises enzimáticas da SOD, CAT, APX e fenilalanina amônia liase (PAL). Para a determinação da atividade específica das enzimas, foi realizada a quantificação de proteínas totais, de acordo com a metodologia de Bradford (1976).

Para avaliar o teor de H₂O₂ e a peroxidação lipídica foi obtida uma extração a frio com tampão ácido, conforme metodologia proposta por Alexieva et al. (2001) e Buege e Aust (1978), respectivamente. Cerca de 70 mg de tecido foliar pulverizado em cadinho com nitrogênio líquido, sendo posteriormente depositados em *ependorf* acrescentando-se 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%, centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4 °C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C durante o período das análises.

2.1 Metabolismo antioxidante

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), conforme proposto por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 10 µL do extrato enzimático a 190 µL do meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. A placa de acrílico UV contendo o meio de incubação mais amostra foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W por 10 minutos. Para o controle, foi utilizado o mesmo meio de reação sem a amostra, que foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm em espectrofotômetro de ELISA e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = (A560 amostra com extrato enzimático – A560 controle sem enzima)/(A560 controle sem enzima). Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) nas condições do ensaio.

A atividade da enzima CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1981), em que uma alíquota de 10 μL do extrato enzimático foi adicionada a 190 μL do meio de incubação contendo 100 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 10 μL de peróxido de hidrogênio 12,5 mM e 80 μL de água destilada incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio através do espectrofotômetro de ELISA. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corrigido para 18 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 10 μL do extrato enzimático foi adicionada a 190 μL de tampão de incubação composto por 100 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 10 μL de ácido ascórbico 10 mM, 10 μL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 70 μL de água destilada (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corrigido para 1,4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

O teor de H_2O_2 foi determinado através da metodologia descrita por Alexieva et al. (2001). Foi uma alíquota de 10 μL do extrato, 40 μL de TCA 0,1%, 50 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e 100 μL de iodeto de potássio 1 M. As leituras foram feitas em placas no espectrofotômetro de ELISA a 390 nm. O teor de H_2O_2 foi calculado com base na curva padrão de H_2O_2 .

A peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como descrito por Buege e Aust (1978). Dez microlitros do sobrenadante foram adicionados a 190 μL do meio de reação (0,5% (w/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (w/v) de TCA, incubados então a 95 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida rapidamente

por um resfriamento no gelo, e a absorbância medidas foram determinadas em um espectrofotômetro de ELISA em 535 nm e 600 nm. A concentração do complexo MDA / TBARS foi calculada utilizando a extinção coeficiente de 1,55 mmol L⁻¹.cm⁻¹. Assim como para a atividade da CAT e da APX o coeficiente de extinção molar foi corrigido para 77 µmol.L⁻¹cm⁻¹ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

2.2 Metabolismo dos fenólicos

A atividade da PAL foi avaliada segundo Mori, Sakurai e Sakuta (2001) modificado, em que uma alíquota de 50 µL do extrato enzimático foi adicionada a 150 µL do meio de incubação contendo 100 µL de tampão Tris-HCl pH 8,8 a 100 mM e 50 µL de fenilalanina a 40 mM. Após incubar a 37 °C por 30 minutos, a reação foi paralizada com 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 25%. Foram coletados 180 µL e transferidos para placa UV. A atividade foi determinada a 280 nm em espectrofotômetro de ELISA.

O teor de fenólicos totais e ligninas foram determinados de acordo com Rodrigues et al. (2005) modificado. A extração foi realizada a frio com o tecido foliar pulverizado em cadinho com nitrogênio líquido e posteriormente liofilizado por 6 h. Cerca de 30 mg de tecido seco foi depositados em *ependorf* acrescentando-se 1,5 mL de metanol 80% e mantendo sob agitação por 15 h a temperatura ambiente e no escuro. O extrato foi centrifugado a 12000 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para quantificar os fenólicos e o precipitado a lignina.

Para a quantificação dos fenólicos solúveis totais, foram misturados 30 µL do extrato metanólico e 30 µL do reagente de *Folin-Ciocalteu* a 0,25 N em placa Elisa, permanecendo em repouso por 5 minutos. Depois foram adicionados 30 µL de carbonato de sódio a 1 M e homogenizado por 10 minutos.

Acrescentou-se mais 160 μL de água destilada, manteve em repouso por 1 h e centrifugou a 3700 rpm por 5 minutos. Foram coletados 180 μL dessa mistura e depositado em outra placa Elisa. Todas essas etapas foram realizadas a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi efetuada a 725 nm. O conteúdo de fenólicos solúveis totais foi calculado com base na curva padrão de catecol e o valor expresso em mg de catecol por g de biomassa seca.

A lignina foi quantificada ressuspendendo-se o precipitado em 1,5 mL de metanol 80% e centrifugando a 12000 g por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e secou o precipitado a 65 °C durante quatro horas. O precipitado seco foi ressuspensão em 1,5 mL de solução 1:10 de ácido tioglicólico e ácido clorídrico a 2 M e homogeneizado suavemente em banho-maria a 100 °C por quatro horas. Resfriou-se em gelo por 10 minutos e centrifugou a 12000 g por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1,5 mL de água destilada e submetido à centrifugação a 12000 g por 10 minutos sob 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 1,5 mL de hidróxido de sódio a 0,5 M, mantido sob agitação por 15 h em temperatura ambiente e submetido à centrifugação a 12000 g por 10 minutos sob 4 °C. O sobrenadante foi coletado, adicionado a 200 μL de ácido clorídrico concentrado, mantido em gelo por quatro horas e centrifugado a 12000 g por 10 minutos sob 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 2 mL de hidróxido de sódio a 0,5 M e homogeneizado em vórtex. Foi coletado 20 μL desse extrato, depositado em placa Elisa UV com 180 μL de hidróxido de sódio a 0,5 M. A leitura da absorbância foi efetuada a 280 nm. O conteúdo de lignina foi calculado com base na curva padrão de lignina e o valor expresso em mg de lignina por g de biomassa seca.

Etapa 4 - Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o: blocos casualizados e os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e a análise de variância, sendo as médias qualitativas submetidas ao teste de *Tukey* ou *Scott-Knott* ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram efetuadas em programa estatístico *SISVAR* versão 4.3 (FERREIRA, 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência da quitosana

A atividade da SOD e o teor de peróxido de hidrogênio não foram influenciados pelo tratamento com quitosana, somente pelo estágio de desenvolvimento da folha, com maior valor nas folhas completamente expandidas (Tabela 1). A APX foi ativada pelos tratamentos com quitosana e pelo solvente, sendo maior a atividade nas folhas completamente expandidas. Enquanto que a atividade da CAT foi maior apenas na maior concentração de quitosana. A peroxidação lipídica foi maior na maior concentração de quitosana e nas folhas completamente expandidas.

Tabela 1 Atividade das enzimas SOD, APX e CAT e teores de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica em folhas de *Piper mollicomum* Kunth submetidas a diferentes concentrações de quitosana

Estádio de desenvolvimento da folha	Tratamentos					Média
	Sem elicitar	Solvente	2,50 g L ⁻¹	5 g L ⁻¹	10 g L ⁻¹	
	Atividade da SOD (U em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MF.mg⁻¹ de proteína)					
Em desenvolvimento	1,89	2,23	2,6	2,38	2,16	2,25 B
Completamente expandida	2,71	2,9	2,78	3,41	2,59	2,88 A
Média	2,3	2,56	2,69	2,9	2,38	
	Teor de H₂O₂ ($\mu\text{g.g}^{-1}$ MF)					
Em desenvolvimento	0,5546	0,7089	0,5517	0,3679	0,2396	0,4845 B
Completamente expandida	0,762	1,0899	1,0424	0,7813	1,1708	0,9693 A
Média	0,6583	0,8994	0,7971	0,5746	0,7052	
	Atividade da APX ($\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ MF.mg⁻¹ de proteína)					
Em desenvolvimento	0,3543	0,5328	0,5809	0,4039	0,4656	0,4675 B
Completamente expandida	0,4256	0,6553	0,6108	0,6584	0,8217	0,6344 A
Média	0,3900 b	0,5941 a	0,5959 a	0,5312 a	0,6437 a	
	Atividade da CAT ($\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína)					
Em desenvolvimento	0,0125	0,0067	0,0061	0,0031	0,0185	0,0094
Completamente expandida	0,0069	0,0058	0,007	0,0099	0,0112	0,0082
Média	0,0097 b	0,0063 b	0,0065 b	0,0065 b	0,0149 a	
	Peroxidação lipídica ($\mu\text{mol de MDA.g}^{-1}$ MF)					
Em desenvolvimento	0,112	0,1817	0,205	0,1636	0,1175	0,1560 B
Completamente expandida	0,7138	0,6736	0,4835	0,6469	1,0469	0,7129 A
Média	0,4129 b	0,4277 b	0,3443 b	0,4053 b	0,5822 a	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knot* a 5% de probabilidade

A SOD desempenha um papel central na defesa contra o estresse oxidativo, catalisando a dismutação do O_2^- a oxigênio e H_2O_2 (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). O aumento na atividade da SOD é geralmente correlacionada com uma maior tolerância da planta contra os estresses ambientais (XU et al., 2007; SHARMA et al., 2012). Aumento na atividade da SOD em função da aplicação de quitosana foi observado em diversos trabalhos (XU et al., 2007; FAN et al., 2010; LEI et al., 2011). No entanto, neste ensaio, a atividade da SOD não foi influenciada pelo tratamento com quitosana, o que pode ser um indicativo de baixa tolerância ao estresse.

Como não foi observada alteração no teor de peróxido de hidrogênio, poderia ser um indicativo de que a aplicação de quitosana não influenciou na produção dessa espécie reativa, corroborando com a baixa atividade da SOD. No entanto, como a APX e a CAT foram ativadas pelo uso de quitosana, e sendo o H_2O_2 , substrato para ambas as enzimas, provavelmente outras fontes, que não a atividade da SOD estão contribuindo para a liberação de H_2O_2 . É documentada diversas reações metabólicas que originam o H_2O_2 , inclusive espontaneamente (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; BHATTACHARJEE, 2012).

Aliado a ativação dessas enzimas antioxidantes e ao baixo teor de H_2O_2 encontrado, pode-se concluir que todo o H_2O_2 produzido está sendo controlado ou ainda, direcionado para a ativação de outros mecanismos de defesa, devido ao seu papel como mensageiro secundário dessa molécula. A função do H_2O_2 como mensageiro, é bem caracterizada, como a sua participação no crescimento e produção de metabólitos secundários (APEL; HIRT, 2004; GARG; MANCHANDA, 2009).

A APX foi ativada por todos os tratamentos com quitosana, inclusive pelo solvente, que devido ao seu caráter ácido já é um agente estressante. A elevada afinidade para o H_2O_2 da APX torna-a uma enzima capaz de

desintoxicar a baixas concentrações, sendo muito útil para uma regulação fina de peróxido de hidrogênio (NOCTOR; FOYER, 1998). É considerada como uma das enzimas antioxidantes mais amplamente distribuídas em células de plantas e devido a maior afinidade para o H_2O_2 que a CAT, são eliminadoras eficientes sob condições de estresse (SHARMA et al., 2012). Segundo Lei et al. (2011), o tratamento com quitosana promoveu aumento na atividade da APX, semelhante ao observado para a CAT.

É interessante notar que apenas a maior concentração de quitosana estimulou a CAT, condizendo com Noctor e Foyer (1998), que disseram que a sua baixa afinidade pelo H_2O_2 e a velocidade de reação alta, torna-a candidata ideal para a eliminação sob condições de estresse elevado. Segundo Willekens et al. (1997), a CAT é fundamental para a manutenção do equilíbrio redox durante o estresse oxidativo em plantas do tipo C_3 . Outros trabalhos corroboram com os resultados do presente estudo, nos quais o tratamento com quitosana aumentou a atividade da CAT (MANDAL, 2010; LEI et al., 2011; ZENG; LUO, 2012).

A maior peroxidação lipídica encontrada apenas na maior concentração de quitosana corrobora com a ativação da CAT, indicando que realmente esse tratamento acarretou em estresse elevado à célula. Essa explosão oxidativa excedeu a capacidade de controle da célula, acarretando em dano por peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos para os ácidos nucleicos, inibição de enzimas e ativação da morte celular programada (SHARMA et al., 2012). De fato isso foi observado neste tratamento, em que as folhas completamente expandidas na maior concentração apresentaram o bordo necrosado e inúmeros pontos necróticos no limbo, vindo a sofrer abscisão durante o período do experimento (dados não mostrados). O solvente e as demais concentrações de quitosana nas folhas completamente expandidas também apresentaram a necrose, no entanto, não sofreram abscisão. Nas folhas

em desenvolvimento também foi observado necrose, mas não sofreram abscisão, nem na maior concentração.

Vale mencionar, que o H_2O_2 pode-se combinar com o Fe^{+2} , na reação denominada de “reação de *Fenton*” e originar o radical hidroxila (OH^\cdot) e o Fe^{+3} , resultante dessa reação, pode ser reduzido novamente pelo radical superóxido, provendo substrato para que a “reação de *Fenton*” continue. O conjunto dessas duas reações é conhecido como reação de “*Haber-Weiss*” (BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998). Os radicais hidroxílicos (OH^\cdot), por serem extremamente reativos, iniciam reações oxidativas que resultam na peroxidação de lipídios da membrana, em danos ao DNA, proteínas e pequenas moléculas (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002), podendo resultar até em morte celular. Provavelmente a maior concentração de quitosana contribuiu para a reação de *Haber-Weiss/Fenton* com o radical livre atacando as membranas celulares (QUEVAL et al., 2008), explicando o aumento da peroxidação lipídica.

Por último, a maior atividade da SOD, teor de peróxido de hidrogênio, atividade da APX e peroxidação lipídica nas folhas completamente expandidas pode ser explicada pelo maior grau de desenvolvimento das estruturas celulares, que provavelmente é encontrada com o avanço do desenvolvimento, contribuindo para um metabolismo mais ativo. Entretanto, esse fato não interferiu na influência da quitosana no metabolismo antioxidante.

Com relação à influência da quitosana no metabolismo fenólico (Tabela 2), pode ser observado que a atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) e teores de fenólicos totais foram superiores nas plantas eliciadas com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de quitosana e nas folhas completamente expandidas.

Tabela 2 Atividade da fenilalanina amônia liase e teores de fenolicos totais e lignina em folhas de *Piper mollicomum* Kunth submetidas a diferentes concentrações de quitosana

Estádio de desenvolvimento da folha	Tratamentos					Média
	Sem elicitar	Solvente	2,50 g L ⁻¹	5 g L ⁻¹	10 g L ⁻¹	
	Atividade da Fenilalanina amônia liase (U em nmol.g⁻¹ MF.mg⁻¹ de proteína)					
Em desenvolvimento	83,29	93,93	100,63	90,39	92,35	92,12 B
Completamente expandida	88,17	108,08	110,84	110,49	98,87	103,29 A
Média	85,73 b	101,00 ab	105,74 a	100,44 ab	95,62 ab	
	Teor de fenólicos totais (mg de catecol.g⁻¹ MF)					
Em desenvolvimento	10,29	9,14	14,06	9,39	8,91	10,36 B
Completamente expandida	13,13	11,02	14,82	13,28	10,36	12,52 A
Média	11,71 ab	10,08 b	14,44 a	11,33 ab	9,63 b	
	Teor de lignina (mg.g⁻¹ MF)					
Em desenvolvimento	5,17 Ba	1,28 Bb	2,90 Bb	2,01 Bb	3,00 Bb	2,87
Completamente expandida	7,59 Aab	8,73 Aa	8,69 Aa	7,40 Aab	5,08 Ab	7,5
Média	6,38	5	5,8	4,7	4,04	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Como pode ser observado na tabela 2, o teor de lignina foi sempre maior nas folhas completamente expandidas. A aplicação de diferentes concentrações de quitosana promoveu uma resposta diferencial no teor de lignina em função do estágio de desenvolvimento da folha. Nas folhas em desenvolvimento, a quitosana e o solvente reduziram o acúmulo de lignina, enquanto nas completamente expandidas, a lignina foi superior nas plantas pulverizadas com o solvente e com 2,5 g L⁻¹ de quitosana.

A menor concentração de quitosana foi a mais efetiva na promoção da atividade da PAL e no acúmulo de fenólicos totais. Esse resultado pode ser explicado, porque dependendo da concentração, a quitosana promove a morte celular programada e a hipersensibilidade associadas às respostas em plantas (IRITI; FAORO, 2007; VASIL'EV et al., 2009; SAMUILOV et al., 2010; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011), fato que pode ter contribuído para a redução no metabolismo dos fenólicos, principalmente na concentração mais elevada.

Diversos autores observaram forte indução na atividade da fenilalanina amônia liase e no teor de fenólicos totais pela aplicação de quitosana (KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2003; KIM et al., 2005; CHAKRABORTY; KARUN; MITRA, 2009; MANDAL, 2010; SEDIGHEH et al., 2012). A rota dos compostos fenólicos conduz à síntese de muitos metabólitos secundários, como a lignina, antocianinas, flavonoides e isoflavonas (YU; MCGONIGLE, 2005), muitos dos quais relacionados com a resposta de defesa.

Nas folhas em desenvolvimento, a quitosana e o solvente reduziram o acúmulo de lignina, enquanto nas completamente expandidas, o teor de lignina também foi induzido pela menor concentração de quitosana, semelhante ao observado para a atividade da PAL e acúmulo de fenólicos totais. Esse aumento na lignina também pode estar relacionado com o papel de H₂O₂ como mensageiro secundário, uma vez que, na última etapa da via de síntese de

lignina, as peroxidases catalisam a polimerização dos monolignóis e utilizam o H_2O_2 como substrato (VANHOLME et al., 2010), portanto essa molécula dispara a química de lignificação (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Diversos autores observaram que a quitosana promove um aumento no conteúdo da lignina total ou de seus precursores (XU et al., 2007; SIRCAR; MITRA, 2009; MANDAL, 2010; SEDIGHEH et al., 2012), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Por outro lado, o aumento nos fenólicos também pode ter contribuído para a eliminação do H_2O_2 , devido à forte capacidade para doar elétrons ou átomos de hidrogênio, podendo quelar íons de metais de transição, sequestrar espécies moleculares de oxigênio ativo e inibir a peroxidação lipídica, através do aprisionamento dos radicais lipídicos alcóxido (ARORA et al., 2000; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). Eles também são capazes de estabilizar as membranas, diminuindo a sua fluidez, o que acarretaria em uma redução na mobilidade dos radicais livres na bicamada lipídica, resultando na inibição da peroxidação lipídica devido a um abrandamento nas reações desses radicais (ARORA et al., 2000). Além disso, especialmente, os flavonoides e os fenilpropanoídicos são oxidados por peroxidase, agindo na eliminação de H_2O_2 (SHARMA et al., 2012).

A maior atividade da PAL e nos teores de fenólicos totais e lignina em folhas completamente expandidas, também pode ser explicada pela maior capacidade metabólica em função do maior grau de desenvolvimento da folha.

3.2 Influência do jasmonato de metila

A atividade da SOD e o teor de peróxido de hidrogênio foram superiores nas folhas tratadas com 2 mM de jasmonato de metila (Tabela 3). Nas folhas

completamente expandidas a atividade da SOD foi superior, enquanto nas em desenvolvimento foi maior o teor de peróxido de hidrogênio.

A aplicação de diferentes concentrações de jasmonato de metila promoveu uma resposta diferencial na atividade da APX em função do estágio de desenvolvimento da folha. Nas folhas completamente expandidas a APX foi ativada pelos tratamentos com eliciadores, inclusive pelo solvente, enquanto nas em desenvolvimento não diferiu. No solvente com a maior concentração de jasmonato de metila, as folhas completamente expandidas apresentaram atividade de APX maior que as em desenvolvimento.

A aplicação de jasmonato de metila também promoveu uma resposta diferencial na atividade da CAT em função do estágio de desenvolvimento da folha. Nas folhas completamente expandidas a atividade da CAT foi maior apenas com 8 mM de jasmonato de metila, enquanto nas em desenvolvimento não diferiu. As folhas completamente expandidas apresentaram maior atividade de CAT com a aplicação de jasmonato de metila.

Tabela 3 Atividade das enzimas SOD, APX e CAT e teores de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica em folhas de *Piper mollicomum* Kunth submetidas a diferentes concentrações de jasmonato de metila

Estádio de desenvolvimento da folha	Tratamentos					Média
	Sem elicitar	Solvente	0,50 mM	2 mM	8 mM	
Atividade da SOD (U em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MF.mg^{-1} de proteína)						
Em desenvolvimento	1,54	1,54	1,41	1,56	1,25	1,46 B
Completamente expandida	2	2,18	2,38	2,72	2,19	2,29 A
Média	1,77 b	1,86 b	1,89 b	2,14 a	1,72 b	
Teor de H_2O_2 ($\mu\text{g.g}^{-1}$ MF)						
Em desenvolvimento	0,4879	0,9045	0,4611	1,1595	0,544	0,7114 A
Completamente expandida	0,4824	0,4367	0,4703	0,7443	0,3073	0,4882 B
Média	0,4851 b	0,6706 b	0,4657 b	0,9519 a	0,4257 b	
Atividade da APX ($\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ MF.mg^{-1} de proteína)						
Em desenvolvimento	0,0124 Aa	0,0147 Ba	0,0279 Aa	0,0221 Aa	0,0114 Ba	0,0177
Completamente expandida	0,0144 Ab	0,0382 Aa	0,0321 Aa	0,0339 Aa	0,0427 Aa	0,0323
Média	0,0134	0,0264	0,0300	0,0280	0,0270	
Atividade da CAT ($\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína)						
Em desenvolvimento	0,0060 Aa	0,0116 Aa	0,0072 Ba	0,0060 Ba	0,0024 Ba	0,0066
Completamente expandida	0,0086 Ab	0,0101 Ab	0,0134 Ab	0,0091 Ab	0,0261 Aa	0,0135
Média	0,0073	0,0108	0,0103	0,0076	0,0143	
Peroxidação lipídica ($\mu\text{mol de MDA.g}^{-1}$ MF)						
Em desenvolvimento	38,42	53,8	46,84	48,22	39,64	45,38
Completamente expandida	38,76	47,86	49,12	47,6	38,62	44,4
Média	38,58	50,82	47,98	47,9	39,12	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knot* a 5% de probabilidade

A peroxidação lipídica não foi influenciada pelo tratamento com jasmonato de metila (Tabela 3).

A maior atividade da SOD condiz com o aumento no teor de peróxido de hidrogênio, estando de acordo com a função dessa enzima de realizar a dismutação do O_2^- a oxigênio e H_2O_2 (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). A maior atividade da SOD pode levar a uma maior tolerância da planta contra estresses ambientais (XU et al., 2007; SHARMA et al., 2012). A ativação da SOD em função da aplicação de jasmonato de metila já foi relatada em outros trabalhos (COMPAROT; GRAHAM; REID, 2002; JUNG, 2004; AFTAB et al., 2011; ANJUM et al., 2011).

O jasmonato de metila induz a explosão oxidativa, com a geração de H_2O_2 (GARRIDO et al., 2003; PARRA-LOBATO et al., 2009; SOARES et al., 2010; AFTAB et al., 2011; ALMAGRO et al., 2012), corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

As resposta das enzimas antioxidantes à aplicação de jasmonato de metila nas folhas completamente expandidas, foram semelhantes à quitosana, e da mesma forma, está de acordo com as suas funções na planta. Diversos autores relatam que o jasmonato de metila promove aumento na atividade das enzimas antioxidantes, APX (COMPAROT; GRAHAM; REID, 2002; ALI et al., 2006; PARRA-LOBATO et al., 2009; SOARES et al., 2010) e CAT (JUNG, 2004; PARRA-LOBATO et al., 2009; MANDAL, 2010; AFTAB et al., 2011; ANJUM et al., 2011).

Segundo Liang et al. (2012), a maior parte da proteção contra o estresse oxidativo em plantas tratadas com jasmonato de metila podem surgir a partir de antioxidantes enzimáticos.

Neste trabalho, o jasmonato de metila não teve influência na peroxidação lipídica. Em outros trabalhos é relatado que a ativação do sistema

antioxidante enzimático pela ação do jasmonato de metila promoveu redução na peroxidação lipídica (ANJUM et al., 2011; AFTAB et al., 2011).

O estágio de desenvolvimento da folha interferiu na resposta antioxidante. A atividade da SOD nas folhas completamente expandidas foi superior, enquanto o peróxido de hidrogênio foi maior nas em desenvolvimento. As atividades da APX e CAT não diferiram nas folhas jovens. O maior teor de peróxido de hidrogênio nas folhas em desenvolvimento pode ser explicado pela baixa eficiência do sistema antioxidante observada neste estágio de desenvolvimento. Assim como observado para a quitosana, o menor desenvolvimento das folhas em desenvolvimento provavelmente contribuiu para essa resposta.

Nas folhas em desenvolvimento a aplicação de jasmonato de metila a 2 mM e a 8 mM acarretou em necrose na ponta do limbo, sendo que na maior concentração essa necrose recobria cerca de 30 a 50% do limbo (dados não apresentados).

A influência do jasmonato de metila no metabolismo fenólico pode ser observada na tabela 4.

Tabela 4 Atividade da fenilalanina amônia liase e teores de fenólicos totais e lignina em folhas de *Piper mollicomum* Kunth submetidas a diferentes concentrações de jasmonato de metila

Estádio de desenvolvimento da folha	Tratamentos					
	Sem elicitar	Solvente	0,5 mM	2 mM	8 mM	Média
	Atividade da Fenilalanina amônia liase (U em nmol.g⁻¹ MF.mg⁻¹ de proteína)					
Em desenvolvimento	98,66 Aab	79,16 Bb	118,90 Aa	113,66 Ba	95,74 Bab	105,82
Completamente expandida	108,77 Ab	144,48 Aa	118,1 Aab	146,48 Aa	142,41 Aa	132,05
Média	103,72	111,82	118,5	130,07	119,08	
	Teor de fenólicos totais (mg de catecol.g⁻¹ MF)					
Em desenvolvimento	19,64	18	20,43	17,48	17,93	18,70
Completamente expandida	18,7	19,48	20,04	17,9	19,18	19,06
Média	19,17 ab	18,74 ab	20,23 a	17,69 b	18,56 ab	
	Teor de lignina (mg.g⁻¹ MF)					
Em desenvolvimento	3,16	2,89	3,28	2,81	2,88	3,00
Completamente expandida	3,01	3,13	3,22	2,88	3,08	3,06
Média	3,08 ab	3,01 ab	3,25 a	2,84 b	2,98 ab	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Pode-se observar que nas folhas em desenvolvimento a fenilalanina amônia liase foi superior nas plantas eliciadas com 0,5 e 2 mM de jasmonato de metila e menor no solvente. Nas folhas completamente expandidas a maior atividade da PAL foi observada no solvente e em plantas eliciadas com 2 e 8 mM de jasmonato de metila, em relação ao controle sem elicitar. Os teores de fenólicos totais e a lignina foram superiores com 0,5 e inferior com 2 mM de jasmonato de metila.

As menores concentrações de jasmonato de metila promoveram maior ativação da PAL nas folhas em desenvolvimento, enquanto as maiores concentrações ativaram a PAL nas folhas completamente expandidas. Provavelmente esse resultado é devido ao grau de desenvolvimento dos tecidos foliares, uma vez que possa ter havido, por exemplo, maior espessamento de epiderme nas folhas completamente expandidas, o que poderia contribuir para reduzir a penetração do eliciador, sendo que o inverso poderia ter ocorrido nas folhas em desenvolvimento, causando efeito fitotóxico na maior concentração.

A indução da PAL pelo jasmonato de metila tem sido observada por diversos autores (MIZUKAMI; TABIRA; ELLIS, 1993; GALIS et al., 2006; KIM et al., 2007; SIRCAR; MITRA, 2008; XIAO et al., 2009). Galis et al. (2006) identificaram um fator de transcrição regulado pelo jasmonato de metila que induz uma série de genes do metabolismo dos fenilpropanoide, inclusive da PAL, além de dirigir o acúmulo de vários fenilpropanoides.

Corroborando com os resultados deste trabalho, diversos autores verificaram que a elicitação com jasmonato de metila promove aumento nos fenólicos totais (KIM et al., 2006; KIM et al., 2007; MANDAL, 2010) e no conteúdo da lignina total (MANDAL, 2010; SIRCAR et al., 2012). Pode atuar na promoção da lignificação estimulando enzimas da biossíntese de lignina como a cinamil álcool desidrogenase (MANDAL, 2010).

É interessante notar que o solvente *Tween* 20 (Monolaurato de polioxietileno 20 sorbitano - polissorbato 20) a 0,1%, foi eficiente em promover a indução do sistema antioxidante e dos fenólicos. No cultivo de células, o *Tween* 20 é utilizado para aumentar a permeabilização da membrana e promover a liberação dos metabólitos secundários acumulados intracelularmente em vacúolos (CAI et al., 2012).

A permeabilização das membranas celulares para a liberação de metabólitos secundários é frequentemente relacionada com a perda de viabilidade das células, no caso do *Tween* dependerá da concentração e do tempo de exposição (BOITEL-CONTI et al., 1996; ZHANG et al., 2011). Também são observadas modificações estruturais (LABERCHE et al., 2000) e na membrana de cloroplastos (THOMSON; MOELLER, 1983) e mitocôndrias (CRESCENZO et al., 2001), após aplicação de *Tween* 20, que poderiam ter contribuído para a resposta encontrada neste trabalho.

4 CONCLUSÃO

Nas folhas completamente expandidas o metabolismo dos antioxidantes e dos fenólicos é mais ativo.

A atividade da SOD e o teor de peróxido de hidrogênio não foram influenciados pelo tratamento com quitosana.

A APX foi ativada pelos tratamentos.

A atividade da CAT e a peroxidação lipídica foi maior após aplicação de 10 g L^{-1} de quitosana.

A atividade da PAL e teores de fenólicos totais foram superiores nas plantas pulverizadas com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de quitosana.

A aplicação de quitosana promoveu uma resposta diferencial no teor de lignina em função do estágio de desenvolvimento da folha. Nas folhas em desenvolvimento, a quitosana reduziu o acúmulo de lignina, enquanto nas completamente expandidas, a lignina foi superior nas plantas pulverizadas com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de quitosana.

A atividade da SOD e o teor de peróxido de hidrogênio foram superiores nas folhas tratadas com 2 mM de jasmonato de metila.

A aplicação de jasmonato de metila promoveu uma resposta diferencial na atividade da APX e da CAT, em função do estágio de desenvolvimento da folha.

Nas folhas completamente expandidas a APX foi ativada pelos tratamentos, enquanto a CAT foi maior apenas com 8 mM de jasmonato de metila. Nas folhas em desenvolvimento a atividade dessas enzimas não diferiu.

A peroxidação lipídica não foi influenciada pelo tratamento com jasmonato de metila.

A aplicação de jasmonato de metila promoveu uma resposta diferencial na atividade da PAL, em função do estágio de desenvolvimento da folha.

Nas folhas em desenvolvimento a fenilalanina amônia liase foi superior nas plantas elicitadas com 0,5 e 2 mM de jasmonato de metila. Nas folhas completamente expandidas a maior atividade da PAL foi observada em plantas elicitadas com 2 e 8 mM de jasmonato de metila.

Os teores de fenolicos totais e a lignina foram superiores com 0,5 e inferior com 2 mM de jasmonato de metila.

REFERÊNCIAS

AFTAB, T. et al. Role of salicylic acid in promoting salt stress tolerance and enhanced artemisinin production in artemisia annua L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, n. 4, p. 425–435, Dec. 2011.

ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, Dec. 2001.

ALI, M. B. et al. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 613-620, June 2006.

ALMAGRO, L. et al. Early signaling network in tobacco cells elicited with methyl jasmonate and cyclodextrins. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 51, p. 1-9, 2012.

ANJUM, S. A. et al. Effect of exogenous methyl jasmonate on growth, gas exchange and chlorophyll contents of soybean subjected to drought. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 10, n. 47, p. 9640-9646, Aug. 2011.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, June 2004.

ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, Columbus, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, Oct. 2002.

ARORA, A. et al. “Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids,” **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 373, n. 1, p. 102–109, Jan. 2000.

BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, The Hague, v. 201, p. 137–147, 1998.

BHATTACHARJEE, S. The language of reactive oxygen species signaling in plants. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1-22, 2012.

BITTELLI, M. et al. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Agricultural and Forest Meteorology**, Pullman, v. 107, n. 3, p. 167–175, Apr. 2001.

BOITEL-CONTI, M. et al. Inducer effect of Tween 20 permeabilization treatment used for release of stored tropane alkaloids in *Datura innoxia* Mill hairy root cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 241–244, 1996.

BRADFORD, Marion M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 2, p. 248-254, 1976.

BRITO, M. R. de; SENNA-VALLE, L. de. Plantas medicinais utilizadas na comunidade caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 25, n. 2, p. 363-372, abr./jun. 2011.

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

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.

CAI, Z. et al. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 3, p. 461–477, 2012.

CARNEIRO, M. M. L. C. et al. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 752-761, 2011.

CHAKRABORTY, M.; KARUN, A.; MITRA, A. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166, n. 1, p. 63-71, Jan. 2009.

CHEN, H. P.; XU, L. L. Isolation and characterization of a novel chitosan-binding protein from non-heading chinese cabbage leaves. **Journal of Integrative Plant Biology**, Ney York, v. 47, n. 4, p. 452-456, Apr. 2005.

COMPAROT, S. M.; GRAHAM, C. M.; REID, D. M. Methyl jasmonate elicits a differential antioxidant response in light- and dark-grown canola (*Brassica napus*) roots and shoots. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 38, n. 1, p. 21-30, Sept. 2002.

CORDOVA, S. M. de. et al. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p. 241-244, out./dez. 2010.

CRESCENZO, M. A. P. de et al. Tween-20 activates and solubilizes the mitochondrial membrane-bound, calmodulin dependent NAD⁺ kinase of avena sativa L. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 182, p. 135-146, 2001.

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, set. 2008.

DUARTE, M. C. T. et al. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 8, nesp., p. 139- 143, 2006.

FAN, G. et al. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 9, n. 19, p. 2816-2820, May 2010.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises estatísticas 4.3**. Lavras: UFLA, 1999.

GALIS, I. et al. A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. **The Plant Journal**, New York, v. 46, n. 4, p. 573-592, May 2006.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, Itália, v. 143, n. 1, p. 81-96, Mar. 2009.

GARRIDO, I. et al. Redox-related peroxidative responses evoked by methyljasmonate in axenically cultured aeroponic sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedling roots. **Protoplasma**, New York, v. 221, n. 1-2, p. 79- 91, May 2003.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Washington, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. *Piperaceae* do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 1, p. 21-46, 2004.

HARE, J. D. Variation in herbivore and methyl jasmonate-induced volatiles among genetic lines of *Datura wrightii*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 11, p. 2028-2043, Nov. 2007.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Washington, v. 67, n. 3, p. 450-455, Mar. 1981.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Reviews of Plant Biology**, Michigan, v. 59, p. 41-66, June 2008.

IRITI, M.; FAORO, F. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. **Plant Signaling and Plant Signaling and Behavior**, Milano, v. 4, n. 1, p. 66-68, Jan. 2007.

JUNG, S. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. **Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, Korea, v. 42, n. 3, p. 231-255, Apr. 2004.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, Boston, n. 5, v. 6, p. 709-725, June 2011.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, n. 8, p. 859–863, Aug. 2003.

KIM, H. J. et al. Effect of chitosan on the biological properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 9, p. 3696-3701, Sept. 2005.

KIM, H. J. et al. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 6, p. 2327-2332, June 2006.

KIM, H. J. et al. Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 12, p. 10366-10372, Dec. 2007.

LABERCHE, J. C. et al. Modifications structurales dans les chevelus racinaires de *Datura innoxia* Mill., après un traitement au Tween 20. Revue de cytologie et de biologie végétales, **Le Botaniste**, Paris, v. 23, n. 3-4, p. 3-12, 2000.

LAGO, J. H. G. et al. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (Piperaceae). **Quimica Nova**, Sao Paulo, v. 30, n. 5, p. 1222-1224, set./out. 2007.

LEI, C. et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2011.

LIANG, Z. S. et al. Roles of reactive oxygen species in methyl jasmonate and nitric oxide-induced tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 5, p. 873-883, May 2012.

MANDAL, S. Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 9, n. 47, p. 8038-8047, Nov. 2010.

MANDAL, S.; MITRA, A. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 71, n. 4-6, p. 201-209, Oct./Dec. 2007.

MEDEIROS, M. F. T. et al. Informações estratégicas geradas através do estudo de patentes de plantas medicinais citadas pelos sítiantes da reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiania, v. 4, n. 2, p. 139-147, 2007.

MIZUKAMI, H.; TABIRA, Y.; ELLIS, B. E. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n. 12, p. 706-709, Dec. 1993.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 2, p. 355-360, 2001.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medical plants of Brazil**. Rio de Janeiro: Laemmert, 2000.

MUZZARELLI, R. A. A. Some modified chitosans and their niche applications. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. **Chitin handbook**. Italy: Atec, 1997. p. 47-52.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, June 1981.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy Review**, Erandwane, v. 1, n. 1, p. 69-79, Jan./May 2007.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Simultaneous measurement of foliar glutathione, γ -glutamylcysteyne, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 264, n. 3, p. 98-110, 1998.

PARRA-LOBATO, M. C. et al. Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 66, p. 9-17, 2009.

PENEDO, P. L. M. **Estudo sobre a potencialidade da extração de produtos naturais utilizando CO₂ supercrítico**. 2007. 126 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

QUEVAL, G. et al. Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 135-146, Feb. 2008.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 3, p. 1457-1465, 2003.

REIGADA, J. B. **Bioprospecção em espécies de *Piperaceae***. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003.

RODRIGUES, F. Á. et al. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-Magnaporthe grisea interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, n. 4, p. 144–159, Apr. 2005.

ROSSARD, S. et al. Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 6. p. 1245-1252, Mar. 2006.

SAMUILOV, V. D. et al. Programmed cell death in plants: Protective effect of phenolic compounds against chitosan and H₂O₂. **Biochemistry**, Moscow, v. 75, n. 2, p. 257-263, Feb. 2010.

SANTOS, P. R. D. dos. et al. Essential oil analysis of 10 *Piperaceae* species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 58 p. 547–551, 2001.

SASAKI, Y. et al. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **DNA Research**, Tokyo, v. 8, p. 153-161, July 2001.

SEDIGHEH, E. B. et al. Enhancement of lignan and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *linum album* cell culture. **Iranian Journal of Plant Biology Springer**, Isfahan, v. 4, n. 11, p. 13-25, 2012.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SIRCAR, D. et al. Alternative oxidase (AOX) and phenolic metabolism in methyl jasmonate-treated hairy root cultures of *Daucus carota* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 7, p. 657-663, July 2012.

SIRCAR D.; MITRA, A. Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 4, p. 407-414, Apr. 2008.

SIRCAR, D.; MITRA, A. Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota* 2: Confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166, n. 13, p. 1370-1380, Aug. 2009.

SOARES, A. M. dos et al. Effect of methyl jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H₂O₂ in *Ricinus communis* leaves. **Brazilian Society of Plant Physiology**, California, v. 22, n. 158, p. 151-158, Sept. 2010.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. 4 ed. Cary: SAS Institute, 1990.

THOMSON, W. W.; MOELLER, C. H. Effects of Tween-20, polyoxyethylene sorbitan monolaurate on the ultrastructure and organization of chloroplast membranes. **Protoplasma**, New York, v. 114, p. 173-178, 1983.

VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, Washington, v. 153, n. 3, p. 895-905, July 2010.

VASIL'EV, L. A. et al. Chitosan-induced programmed cell death in plants. **Biochemistry**, Moscow, v. 74, n. 9, p. 1035-1043, Sept. 2009.

WASTERACK, C.; PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 8, p. 302-307, Aug. 1997.

WILLEKENS, H. et al. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 16, p. 4806–4816, Aug. 1997.

XIAO, Y. et al. Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 137, n. 1, p. 1–9, Sept. 2009.

XU, Q. J. M. et al. Effects of chitosan on growth of an aquatic plant (*Hydrilla verticillata*) in polluted waters with different chemical oxygen demands. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 19, p. 217–221, 2007.

YU, O.; MCGONIGLE, B. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 86, p. 147–190, 2005.

ZENG, D.; LUO, X.. Physiological effects of chitosan coating on wheat growth and activities of protective enzyme with drought tolerance. **Open Journal of Soil Science**, Wuhan, v. 2, n. 3, p. 282-288, Sept. 2012.

ZHANG, H. C. et al. Up-regulation of licochalcone A biosynthesis and secretion by Tween 80 in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 47, n. 1, p. 50–56, Jan. 2011.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 23, n. 4, p. 283–333, June 2005.

**CAPÍTULO 3 Ação de eliciadores nas trocas gasosas de *Piper mollicomum*
Kunth**

1 INTRODUÇÃO

Piper mollicomum (*Piperaceae*), conhecida popularmente como jaborandi, embora ainda não seja cultivada comercialmente, possui potencial devido à sua utilidade como medicinal. Possui ação comprovada como antibacteriana (CORDOVA et al., 2010) e antifúngica (LAGO et al., 2007; REIGADA, 2009). É produtora de óleo essencial de elevado rendimento e moderada ação antibacteriana (DUARTE et al., 2006). O porte é arbustivo com altura variando entre 1 a 4 m (CARVALHO-OKANO; ALVEZ, 1998; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; MEDEIROS; SENNA-VALLE; ANDREATA, 2005; GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006; BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008).

No Brasil é amplamente distribuída nos Estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso e Goiás (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006). É encontrada em mata ciliar (RUSCHEL, 2004; MELO; DURIGAN, 2007; ARZOLLA et al., 2010), sendo bastante frequente na floresta ombrófila densa baixo-montana, em altitudes entre 200–600 m.s.m., tanto em locais ensolarados quanto sombreados; ocorre também em restingas; muito comum em áreas antrópicas, como à beira das estradas (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006; ARZOLLA et al., 2010).

Durante o seu desenvolvimento, as plantas são expostas frequentemente a diversas situações estressantes de natureza biótica (insetos, vírus, bactérias e fungos) ou abiótica (radiação ultravioleta, salinidade, temperatura, umidade, metais pesados, dentre outros). Quitosana e jasmonato de metila se destacam como compostos sinalizadores de respostas de defesa sistêmica na interação entre a planta e o patógeno.

Quitosana é um biopolímero hidrofílico formado por moléculas de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (RABEA et al., 2003). É o elemento estrutural do exoesqueleto de insetos e crustáceos (MUZZARELLI, 1997) e encontrado nas paredes celulares de uma variedade de fungos (BITTELLI et al., 2001). A quitosana é liberada pela ação de enzimas das plantas em paredes celulares microbianas (NAMDEO, 2007) e o mecanismo de ação envolve a sua ligação a receptores presentes na membrana celular (CHEN; XU, 2005).

O jasmonato de metila é o metil éster do fito-hormônio ácido jasmônico e caracteriza-se por conter um anel de ciclopentanona com uma cadeia pentenil inserida no C7, um grupo carbonila no C6 e um acetil metilado no C3 (WASTERNAK; PARTHIER, 1997). É biossintetizado pela via do ácido linoleico, pela rota octadecanoide durante a fragmentação da membrana plasmática (SASAKI et al., 2001; HOWE; JANDER, 2008). É produzido em resposta aos ferimentos causados por herbívoros e patógenos especialmente os necrotróficos (BROWSE, 2009).

Quitosana é referido como um antitranspirante eficaz para conservar o uso de água na agricultura (BITTELLI et al., 2001; IRITI et al., 2009). Segundo Bittelli et al. (2001), a aplicação foliar de quitosana induz o fechamento dos estômatos, resultando em diminuição da transpiração e conseqüente redução do uso de água, mantendo a produção de biomassa e o rendimento. O jasmonato de metila também provoca fechamento estomático em diversas espécies de plantas (SANZ et al., 1993; GEHRING et al., 1997; SUHITA et al., 2004; MUNEMASA et al., 2007; MUNEMASA et al., 2011; SAITO et al., 2008; HOSSAIN et al., 2011). Os efeitos da quitosana nas células-guarda é semelhante ao observado pelo ácido abscísico ou jasmonato de metila, indicando uma possível convergência nas vias de transdução de sinal que levam ao fechamento dos estômatos (SRIVASTAVA et al., 2009).

Lee et al. (1999), verificaram que a quitosana promove alterações negativas sobre a taxa fotossintética ao promover o fechamento estomático. No entanto, outros autores têm demonstrado que esse eliciador pode aumentar a fotossíntese em espécies como o milho (KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2002), o manjeriço (KIM et al., 2005) e o quiabeiro (MONDAL et al., 2012).

Diversos genes envolvidos na fotossíntese são reprimidos pela ação do jasmonato de metila (CHEONG; CHOI, 2003). A atividade fotossintética foi fortemente diminuída em canola (ROSSATO et al., 2002). Em soja reduziu o CO₂ intercelulares e a transpiração (ANJUM et al., 2011). Por outro lado, em artemísia, melhorou a eficiência fotossintética, expressada pela maior taxa fotossintética líquida, condutância estomática e concentração intracelular de CO₂ (AFTAB et al., 2011).

Embora algumas espécies apresentem redução na taxa de crescimento sob estresse (BHATTACHARJEE, 2012), o eliciador quitosana é considerado um potenciador do crescimento e produção de várias espécies de interesse econômico (UTHAIRATANAKIJ; SILVA; OBSUWAN, 2007). Promoveu aumento na massa seca e a altura do manjeriço (KIM et al., 2005), no crescimento dos brotos de soja (LEE; KIM; KIM, 2005), no comprimento e massa fresca das raízes e parte aérea e a área foliar de feijoeiro (SHEIKHA; AL-MALKI, 2011).

O efeito do jasmonato de metila no crescimento das plantas é variável entre as espécies. Enquanto alguns autores verificaram redução no crescimento (HEIJARI et al., 2005; ROSSATO et al., 2002), outros relataram aumento (AFTAB et al., 2011). É bem relatado na literatura que o jasmonato de metila inibe o crescimento de raiz (STASWICK; SU; HOWELL, 1992; KIM et al., 2004; HORBOWICZ et al., 2011; RUIZ-MAY et al., 2011). O efeito no crescimento de raiz parece ser dose dependente, mas o efeito é variável entre as espécies (DENG, 2005; LIU; ZHAO; LI, 2007b).

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho, avaliar a influência da aplicação de diferentes concentrações de quitosana e jasmonato de metila sobre as trocas gasosa e o acúmulo de biomassa de *Piper mollicomum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Etapa 1 - Obtenção das mudas

As mudas foram obtidas no Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA. Sementes de *P. mollicomum* foram pré-germinadas em placas de petri sobre três folhas de papel de filtro e mantidas em câmara de germinação do tipo *Mangesdorf* a 25 °C, durante 30 dias. As plântulas foram transferidas para bandejas de polipropileno expandido de 72 células, contendo substrato organo-mineral e mantidas em sala de crescimento por 60 dias para o estabelecimento da muda. A sala de crescimento foi programada para apresentar um fotoperíodo de 12 h, radiação incidente de 300 $\mu\text{mol de quanta. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, umidade relativa ao redor de 60% e temperatura de 25 ± 2 °C.

Após esse período, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de 6 L de substrato (terra de subsolo, areia e esterco bovino, na proporção de 2:1:1) e mantidas em casa de vegetação por 4 meses, sob 50% de sombreamento, utilizando telas pretas, até a submissão dos tratamentos com eliciadores, momento em que as plantas encontravam-se no estágio de florescimento. O ensaio foi conduzido em delineamento blocos casualizados.

Etapa 2 - Elicitação

A quitosana utilizada possui 85% de desacetilação e apresenta fórmula molecular $(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$. As concentrações foram de 2,5; 5 e 10 g L^{-1} , cujas soluções foram preparadas, conforme metodologia descrita por Di Piero e Garda (2008), pela dissolução em ácido clorídrico a 0,05 N com agitação constante e correção do pH para 5,5 com hidróxido de sódio. Como controle foi utilizado plantas não pulverizadas e plantas pulverizadas apenas com o solvente. Em cada

planta foram pulverizadas 200 mL da solução de quitosana, em toda a parte aérea.

O jasmonato de metila foi utilizado nas concentrações de 0,5; 2,0 e 8 mM, preparada solubilizando-se o produto comercial em *Tween* 20 a 0,1%, conforme Hare (2007). Como controle foram utilizadas plantas não submetidas à aplicação de jasmonato de metila e plantas pulverizadas apenas com o solvente. Em cada planta foram pulverizadas 100 mL das soluções, de maneira a umedecer completamente toda a parte aérea, envolvendo ambas as superfícies foliares.

Etapa 3 - Variáveis estudadas

De cada planta foi analisada uma folha em desenvolvimento localizada no segundo nó a partir do ápice e uma folha completamente expandida inserida no terceiro ou quarto nó. Foram analisadas três plantas por tratamento. As avaliações de trocas gasosas foram realizadas aos 6, 12, 18, 24 e 28 dias da aplicação dos eliciadores, utilizando-se um analisador portátil de CO₂ infravermelho (IRGA), modelo ADC-LCA-4 (Hoddesdon, UK), do Laboratório de Ecofisiologia/UFLA, no horário entre as 9 e 11h, em dias ensolarados, sendo avaliadas as seguintes características: fotossíntese líquida (taxa assimilatória líquida de CO₂), transpiração, condutância estomática, concentração de CO₂ intercelular, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, temperatura da folha e da cubeta e umidade relativa. A partir desses dados foram calculados os seguintes parâmetros, a razão entre concentrações de CO₂ intra/extracelular (C_i/C_a), a eficiência instantânea do uso da água (A/E), a eficiência de carboxilação (A/C_i) e a eficiência do uso da radiação (A/PAR).

Foi realizada a partição de biomassa seca (g) das folhas, do caule, do sistema radicular e total. Todo material foi acondicionado em sacos de papel

devidamente identificados e colocado em estufa com circulação forçada de ar a $70 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 72 horas. Após a secagem, o material foi pesado em balança analítica com precisão de 10^{-4} g.

Etapa 4 - Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi em bloco casualizado e os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e análise de variância, sendo as médias submetidas ao teste de *Scott-Knot* ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram efetuadas em programa estatístico *SISVAR* versão 4.3 (FERREIRA, 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência da quitosana

Nas folhas completamente expandidas, a atividade fotossintética (Gráfico 1A) e taxa de transpiração (Gráfico 1D) foram menores na maior concentração de quitosana e não diferiu nos demais tratamentos, enquanto o inverso foi observado para a concentração intracelular de CO₂ (Gráfico 1C). A condutância estomática foi maior nas plantas sem elicitar, seguida do solvente e da quitosana a 2,5 e 5 g L⁻¹ e menor na maior concentração de quitosana (Gráfico 1B).

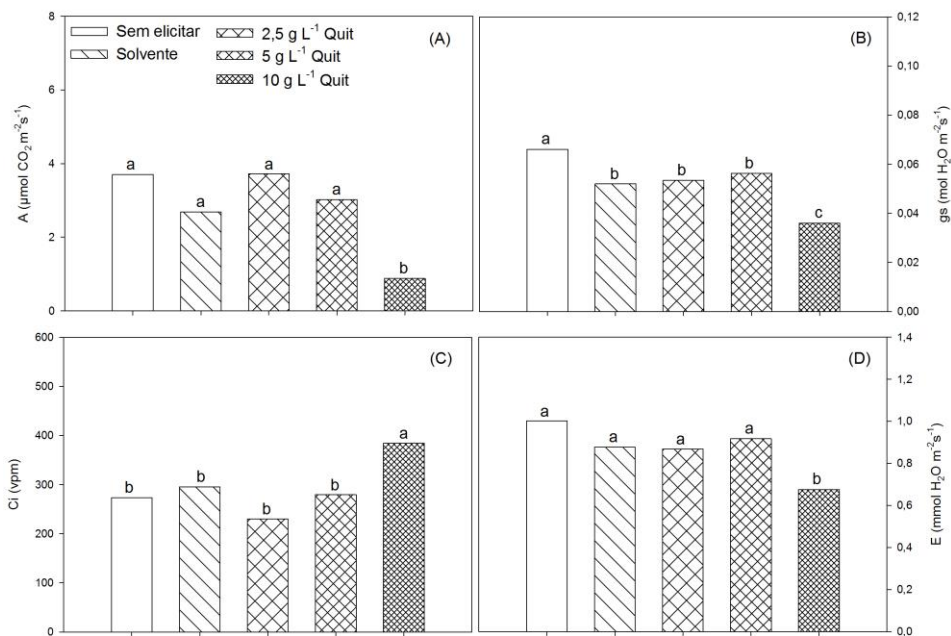


Gráfico 1 (A) A atividade fotossintética (A), (B) A condutância estomática ao vapor de água (gs), (C) A concentração intracelular de CO_2 (Ci) e (D) a taxa de transpiração (E), de folhas completamente expandidas de *Piper mollicomum* após tratamento com quitosana a 2,5, 5 e 10 g L^{-1} , controle sem elicitar e somente com o solvente (ácido clorídrico a 0,05N). Uma análise simples da variância foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos. Os resultados correspondem as médias de seis avaliações realizadas em triplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knot* a 5% de probabilidade.

Nas folhas completamente expandidas, a relação Ci/Ca teve a mesma resposta que o valor de Ci (Gráfico 2A), com maior valor na maior concentração de quitosana e não diferiu nos demais tratamentos. As relações A/E (Gráfico 7B) e A/PAR (Gráfico 7D) apresentaram o mesmo comportamento que A e E, ou seja, reduziu na maior concentração e não diferiu nas demais. Como pode ser evidenciado na figura 7C, a relação A/Ci foi maior na menor concentração de quitosana, seguida das plantas sem elicitar, do solvente e da quitosana a 5 g L^{-1} ,

sendo que estes últimos não diferiram entre si. O menor valor de A/Ci foi na maior concentração.

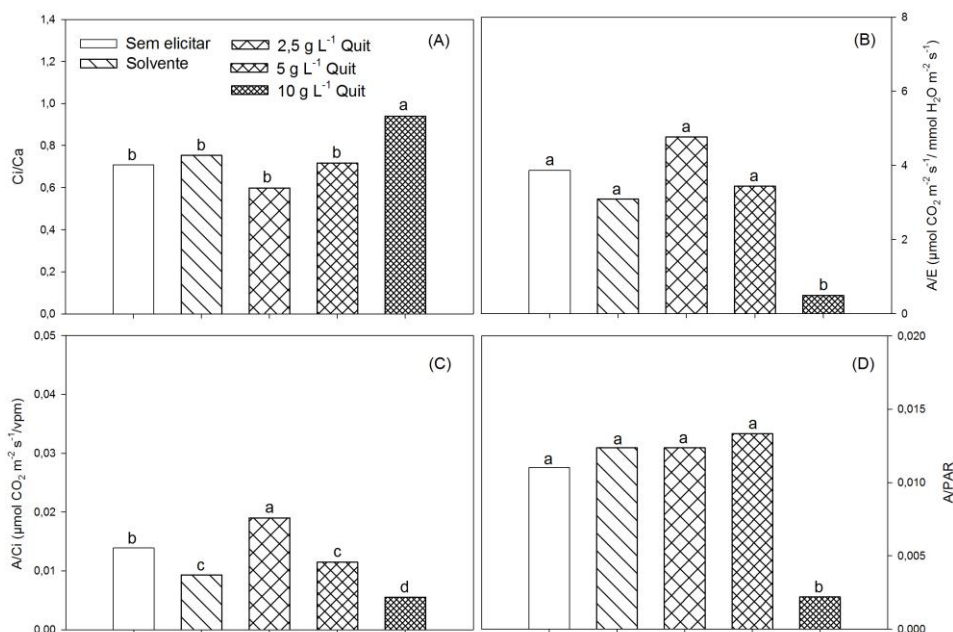


Gráfico 2 (A) A razão entre concentrações de CO₂ intra/extracelular (Ci/Ca), (B) A eficiência instantânea do uso da água (A/E), (C) A eficiência de carboxilação (A/Ci) e (D) A eficiência do uso da radiação (A/PAR), de folhas completamente expandidas de *Piper mollicomum* após tratamento com quitosana a 2,5, 5 e 10 g L⁻¹, controle sem elicitar e somente com o solvente (ácido clorídrico a 0,05N). Uma análise simples da variância foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos. Os resultados correspondem as médias de seis avaliações realizadas em triplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knot* a 5% de probabilidade.

Somente na maior concentração de quitosana foi observada redução na fotossíntese, na condutância estomática, na transpiração e nas relações A/E e A/PAR. Provavelmente a redução acentuada na condutância estomática, aproximada 45% em relação às plantas sem elicitação, foi a causa da diminuição na fotossíntese e na transpiração, bem como nas relações A/E e A/PAR.

Corroborando com os resultados observados neste ensaio, Lee et al. (1999), verificaram alterações negativas sobre a taxa fotossintética ao promover o fechamento estomático. No entanto, outros autores têm demonstrado que esse eliciador pode aumentar a fotossíntese em espécies como o manjeriço (KIM et al., 2005) e do quiabeiro (MONDAL et al., 2012).

A aplicação foliar de quitosana afetou as trocas gasosas de soja e de milho de maneira variável em função do tempo após aplicação (KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2002). No primeiro dia após a aplicação foliar, observaram diminuição da taxa de fotossíntese líquida da soja e do milho, no entanto, nos dias seguintes, houve um aumento. Para o milho esse aumento foi de 10%, no terceiro dia, correlacionado com o aumento da condutância estomática e a taxa de transpiração, enquanto que a concentração intercelular de CO₂ não diferiu. Contudo, para a soja o aumento foi de 8% no segundo dia, juntamente com um aumento na condutância estomática, na taxa de transpiração e na concentração intercelular de CO₂.

A redução na fotossíntese é um agravante para uma possível produção de metabolitos secundários que teriam a função de proteção contra o ataque tornando não palatável para o herbívoro. De fato isso foi observado pela redução na atividade da fenilalanina amônia liase e nos teores de fenólicos totais e ligninas, principalmente na maior concentração de quitosana (Capítulo 2).

Diversos trabalhos relatam que a quitosana promove redução da condutância estomática (BITTELLI et al., 2001; IRITI et al., 2009). O fechamento estomático em função da aplicação de quitosana é induzido pela produção de espécies reativas de oxigênio mediada por peroxidase (catalase) (SRIVASTAVA et al., 2009; KHOKON et al., 2010). O peróxido de hidrogênio é acumulado nas células-guarda durante o fechamento (LEE et al., 1999; IRITI et al., 2009). O aumento na produção de peróxido de hidrogênio, expresso pela

maior atividade da ascorbato peroxidase e da catalase observado neste ensaio (Capítulo 2), também pode ter induzido o fechamento estomático.

Além do efeito nas células-guarda relatado acima, a quitosana na maior concentração forma uma película que recobre toda a superfície foliar, que pode ter dificultado as trocas gasosas, conforme pode ser observado no capítulo 4.

No entanto, na maior concentração de quitosana, foi observado aumento de 41% no C_i e de 32% na relação C_i/C_a . A redução na fotossíntese e na condutância estomática, com aumento de C_i , segundo Iriti et al. (2009), pode sugerir que a assimilação decrescente não é unicamente devida à diminuição na transferência de CO_2 a partir da atmosfera, podendo ser devido à redução da eficiência de carboxilação, fato observado neste ensaio.

O aumento no C_i pode ter sido devido ao possível dano nos cloroplastos causado pela explosão oxidativa evidenciada pela ativação da catalase e peroxidação lipídica na maior concentração de quitosana (Capítulo 2). O dano nos cloroplastos pode ter sido a causa do acúmulo do CO_2 , uma vez que ele não foi utilizado no processo fotossintético, ou mesmo pode ter sido, devido ao aumento da respiração evidenciado em plantas com morte celular programada (LIU et al., 2007a).

É interessante notar que o solvente da quitosana também promoveu redução na condutância estomática. Possivelmente o seu caráter ácido (pH 5,5) teve efeito nas células-guarda. Por outro lado, conforme observado no capítulo 2, o solvente estimulou a atividade da ascorbato peroxidase, o que indica que houve um aumento na síntese de peróxido de hidrogênio, que é bem relatado como composto sinalizador nas células-guarda para o fechamento estomático (LEE et al., 1999; IRITI et al., 2009).

Nas folhas em desenvolvimento a atividade fotossintética foi maior nas plantas sem elicitar, seguido do solvente e da quitosana a 2,5 e 5 g L⁻¹ e menor na maior concentração de quitosana (Gráfico 3A). A condutância estomática foi

maior nas plantas sem elicitar e não diferiu nas demais (Gráfico 3A). O Ci foi menor nas plantas sem elicitar e na quitosana a 2,5 g L⁻¹ e maior nas demais (Gráfico 3C). Como pode ser evidenciado na figura 3D, a taxa de transpiração foi maior nas plantas sem elicitar, seguido do solvente e da quitosana a 5 g L⁻¹. A menor transpiração foi observada na maior concentração e na menor de quitosana.

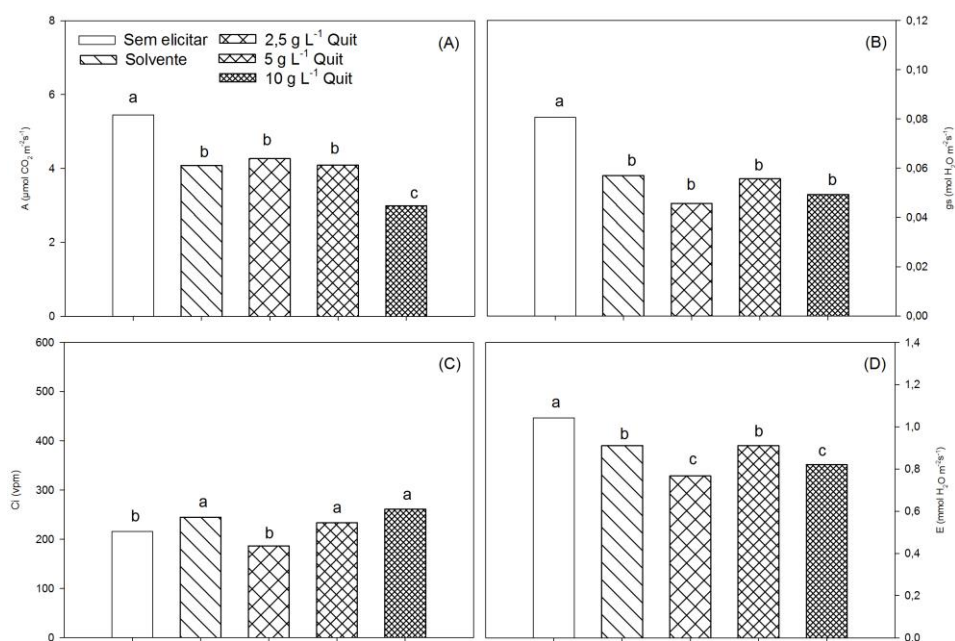


Gráfico 3 (A) A atividade fotossintética (A), (B) A condutância estomática ao vapor de água (gs), (C) A concentração intracelular de CO₂ (Ci) e (D) a taxa de transpiração (E), de folhas em desenvolvimento de *Piper mollicomum* após tratamento com quitosana a 2,5, 5 e 10 g L⁻¹, controle sem elicitar e somente com o solvente (ácido clorídrico a 0,05N). Uma análise simples da variância foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos. Os resultados correspondem às médias de seis avaliações realizadas em triplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knot* a 5% de probabilidade.

Nas folhas em desenvolvimento a relação C_i/C_a foi menor em quitosana a $2,5 \text{ g L}^{-1}$ e não diferiu nas demais (Gráfico 4A). A relação A/E foi maior nas plantas sem elicitar e na $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (Gráfico 4B). A/C_i foi maior nas plantas sem elicitar, seguida na $2,5 \text{ g L}^{-1}$ e menor nas demais concentrações (Gráfico 4C). A relação A/PAR não diferiu entre os tratamentos (Gráfico 4D).

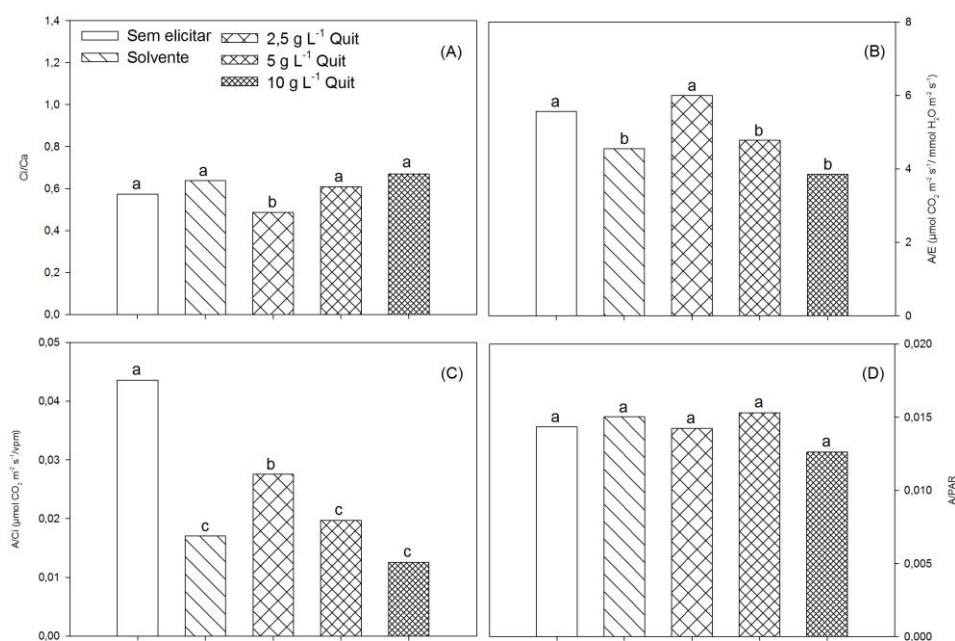


Gráfico 4 (A) A razão entre concentrações de CO_2 intra/extracelular (C_i/C_a), (B) A eficiência instantânea do uso da água (A/E), (C) A eficiência de carboxilação (A/C_i) e (D) A eficiência do uso da radiação (A/PAR), de folhas em desenvolvimento de *Piper mollicomum* após tratamento com quitosana a $2,5$, 5 e 10 g L^{-1} , controle sem elicitar e somente com o solvente (ácido clorídrico a $0,05\text{N}$). Uma análise simples da variância foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos. Os resultados correspondem às médias de seis avaliações realizadas em triplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knot* a 5% de probabilidade.

Aparentemente as folhas em desenvolvimento são mais sensíveis à aplicação de quitosana uma vez que a aplicação de menores concentrações,

inclusive do solvente, já acarretaram em redução da fotossíntese, na condutância estomática e na transpiração, bem como nas relações A/E e A/Ci.

No entanto, na maior concentração a redução na fotossíntese foi maior (cerca de 50%). O grau de desenvolvimento dos tecidos foliares, como por exemplo, menor acúmulo de lignina nas folhas em desenvolvimento (Capítulo 2), poderia ter contribuído para aumentar a penetração do eliciador em relação às folhas completamente expandidas, acarretando em efeito fitotóxico na maior concentração.

É interessante notar que as folhas em desenvolvimento possuem fotossíntese 32% superior em relação às folhas completamente expandidas. Outro fato é que as folhas completamente expandidas na maior concentração de quitosana apresentaram necrose e abscisão durante o período do experimento (dados não apresentados). As folhas em desenvolvimento e as demais concentrações de quitosana nas folhas completamente expandidas também apresentaram a necrose, no entanto, não sofreram abscisão.

Na menor concentração de quitosana o valor de Ci e a transpiração, bem como a relação Ci/Ca, foram menores em relação as concentrações maiores. No entanto, aumentou as relações A/E e A/Ci. O aumento na relação A/E indica que na menor concentração, a quitosana otimiza a absorção de carbono em relação a perda de água. Por outro lado o aumento na relação A/Ci, juntamente com a redução de Ci, indica que o CO₂ absorvido está sendo eficientemente carboxilado em relação às demais concentrações de quitosana, inclusive o solvente.

A redução na fotossíntese e na condutância estomática, sem perda de Ci, segundo Iriti et al. (2009), pode sugerir que a assimilação decrescente não é unicamente devida à diminuição na transferência de CO₂ a partir da atmosfera, podendo ser devido à redução da eficiência de carboxilação.

Em relação ao acúmulo de biomassa seca, não foi observada diferenças estatísticas nas folhas e no caule após aplicação de quitosana (Gráfico 5).

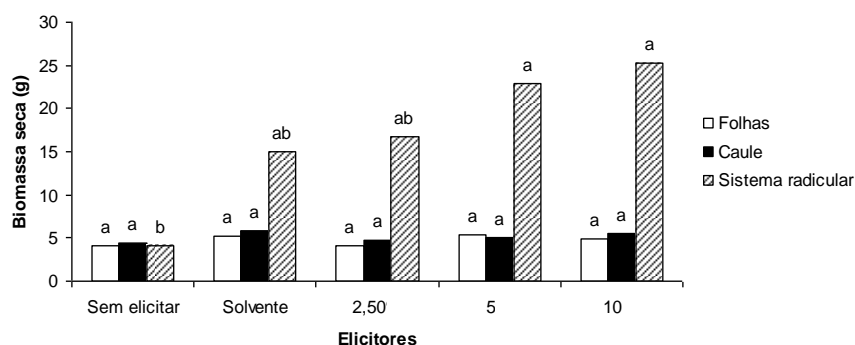


Gráfico 5 Alocação de biomassa em plantas de *Piper mollicomum* após aplicação de quitosana (2,5; 5 e 10 g L⁻¹). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$), quando comparados os eliciadores em cada órgão analisado

No entanto, para o sistema radicular, a aplicação de 5 e 10 g L⁻¹ de quitosana promoveu o maior acúmulo e a testemunha sem elicitar, o menor. Os demais tratamentos promoveram resultados intermediários.

Embora algumas espécies apresentem redução na taxa de crescimento sob estresse (BHATTACHARJEE, 2012), o eliciador quitosana é considerado um potenciador do crescimento e produção em várias espécies de interesse econômico (UTHAIRATANAKIJ et al., 2007). A aplicação foliar de quitosana aumentou o crescimento vegetativo, o rendimento e a qualidade do fruto de pepino (SHEHATA.; FAWZY; EL-RAMADY, 2012), de feijão-caupi (EL TANAHY et al., 2012), de pimentão (GHONAME et al., 2010), do morangueiro (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010), do quiabeiro (MONDAL et al., 2012) e do tomateiro (EL TANTAWY, 2009). Promoveu aumento na massa seca e a altura do manjeriço (KIM et al. 2005), no crescimento dos brotos de soja (LEE et al.,

2005) e no comprimento e massa fresca das raízes e parte aérea e a área foliar de feijoeiro (SHEIKHA; AL-MALKI, 2011).

3.2 Influência do jasmonato de metila

Nas folhas completamente expandidas a atividade fotossintética foi menor nas plantas não eliciadas e na maior concentração do eliciador, enquanto no solvente e no jasmonato de metila a 0,5 mM e 2 mM tiveram o maior valor (Gráfico 6A). Não foram observadas diferenças na condutância estomática (Gráfico 6B), no C_i (Gráfico 6C) e na transpiração (Gráfico 6D).

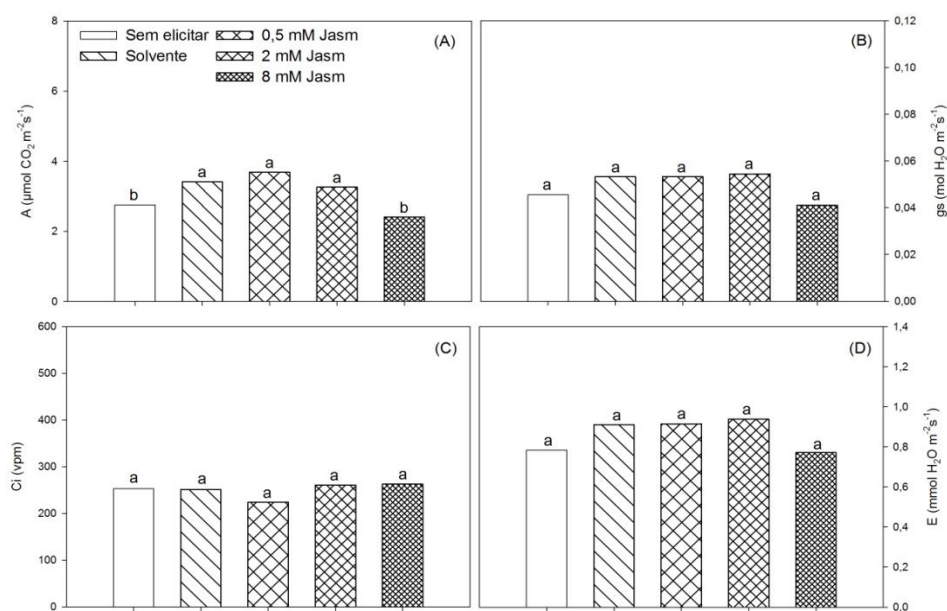


Gráfico 6 (A) A atividade fotossintética (A), (B) A condutância estomática ao vapor de água (g_s), (C) A concentração intracelular de CO_2 (C_i) e (D) a taxa de transpiração (E), de folhas completamente expandidas de *Piper mollicomum* após tratamento com jasmonato de metila a 0,5 mM, 2 mM e 8 mM, controle sem eliciar e somente com o solvente (*Tween* 20 a 0,1%). Uma análise simples da variância foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos. Os resultados correspondem às médias de seis avaliações realizadas em triplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knot* a 5% de probabilidade.

Nas folhas completamente expandidas as relações Ci/Ca (Gráfico 7A) e A/E (Gráfico 7B) não diferiram. A relação A/Ci foi maior na menor concentração de jasmonato de metila e não diferiu nas demais (Gráfico 7C). A relação A/PAR foi menor na maior concentração e não diferiu nas demais (Gráfico 7D).

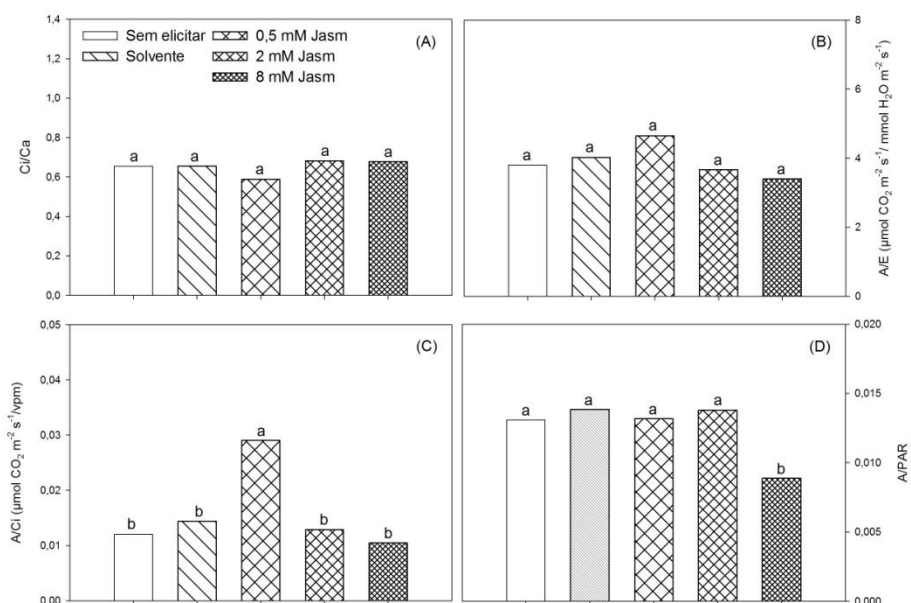


Gráfico 7 (A) A razão entre concentrações de CO_2 intra/extracelular (Ci/Ca), (B) A eficiência instantânea do uso da água (A/E), (C) A eficiência de carboxilação (A/Ci) e (D) A eficiência do uso da radiação (A/PAR), de folhas completamente expandidas de *Piper mollicomum* após tratamento com jasmonato de metila a 0,5 mM, 2 mM e 8 mM, controle sem elicitar e somente com o solvente (*Tween* 20 a 0,1%). Uma análise simples da variância foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos. Os resultados correspondem às médias de seis avaliações realizadas em triplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knot* a 5% de probabilidade.

A aplicação de jasmonato de metila a 0,5 mM e 2 mM, bem como o solvente, promoveram aumento na fotossíntese, sem contudo alterar a condutância estomática, o valor de C_i e a transpiração. Isso sugere que o aumento na fotossíntese pode ser devido a uma maior eficiência do aparato fotossintético independente da absorção de CO_2 .

No entanto, apenas na menor concentração foi observado aumento na eficiência da carboxilação (cerca de três vezes maior que as plantas sem elicitar), o que poderia explicar o aumento na fotossíntese sem alterar as demais características. Esse aumento é importante para a biossíntese de metabolitos secundários que teriam a função de proteção contra a herbivoria pela redução da palatabilidade. De fato, conforme relatado no capítulo 2, a aplicação de jasmonato de metila a 0,05 mM aumentou os teores de fenólicos totais e ligninas.

A maior concentração de jasmonato de metila reduziu a fotossíntese em relação às demais concentrações e o solvente, contudo, não diferiu estatisticamente das plantas sem elicitar. Cheong e Choi (2003) relataram que os genes envolvidos na fotossíntese são reprimidos pela ação do jasmonato de metila, como da ribulose difosfato carboxilase/oxigenase, proteína de ligação clorofila a/b, e captador de luz do complexo II. Outros trabalhos demonstram que a atividade fotossintética e o teor de clorofila foi fortemente diminuída em canola (ROSSATO et al., 2002). Em soja reduziu o teor de clorofila, o concentração de CO_2 intercelulares e a transpiração (ANJUM et al., 2011).

Por outro lado, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, o efeito do jasmonato de metila na fotossíntese em pinheiro silvestre foi dose dependente, aumentando em 10 mM e reduzindo em 100 mM, em relação ao controle (HEIJARI et al., 2005). Em artemísia, melhorou a eficiência fotossintética, expressada pela maior taxa fotossintética líquida, condutância

estomática, concentração interna de CO_2 e teor de clorofila total (AFTAB et al., 2011).

Nas folhas em desenvolvimento a atividade fotossintética não diferiu (Gráfico 8A). A condutância estomática foi menor nas plantas eliciadas em todas as concentração (Gráfico 8B). O valor de C_i (Gráfico 8C) e a transpiração (Gráfico 8D) foram menores na maior concentração de jasmonato de metila e não diferiu nos demais tratamentos.

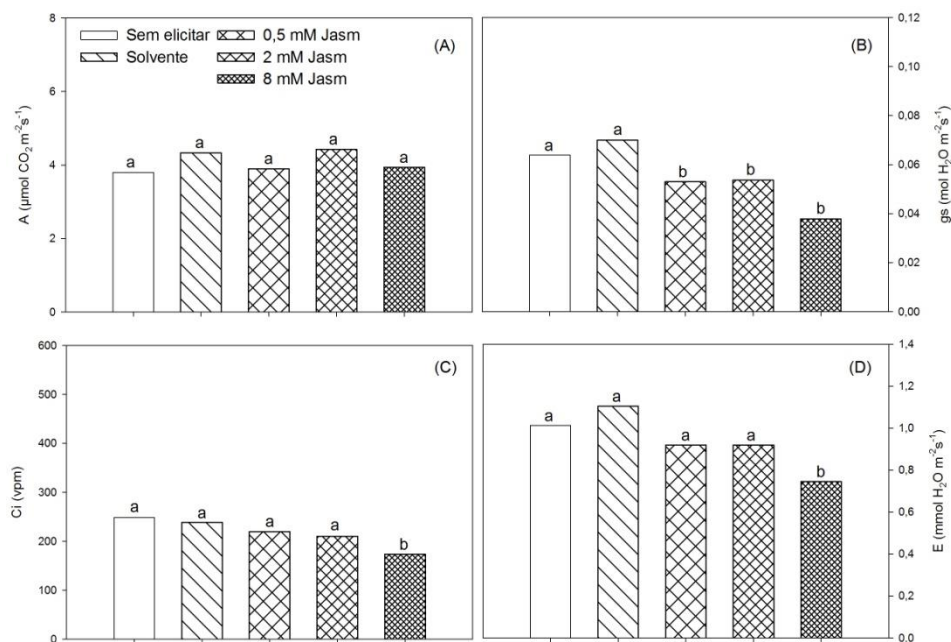


Gráfico 8 (A) A atividade fotossintética (A), (B) A condutância estomática ao vapor de água (gs), (C) A concentração intracelular de CO_2 (C_i) e (D) a taxa de transpiração (E), de folhas em desenvolvimento de *Piper mollicomum* após tratamento com jasmonato de metila a 0,5 mM, 2 mM e 8 mM, controle sem elicitar e somente com o solvente (*Tween 20* a 0,1%). Uma análise simples da variância foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos. Os resultados correspondem as médias de seis avaliações realizadas em triplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knot* a 5% de probabilidade.

Nas folhas em desenvolvimento a relação C_i/C_a foi menor na maior concentração e não diferiu nos demais tratamentos (Gráfico 9A). A relação A/E foi maior na maior concentração e não diferiu nos demais tratamentos (Gráfico 9B). A relação A/C_i não diferiu entre os tratamentos (Gráfico 9C). A relação A/PAR foi menor na maior e na menor concentração de jasmonato de metila (Gráfico 9D).

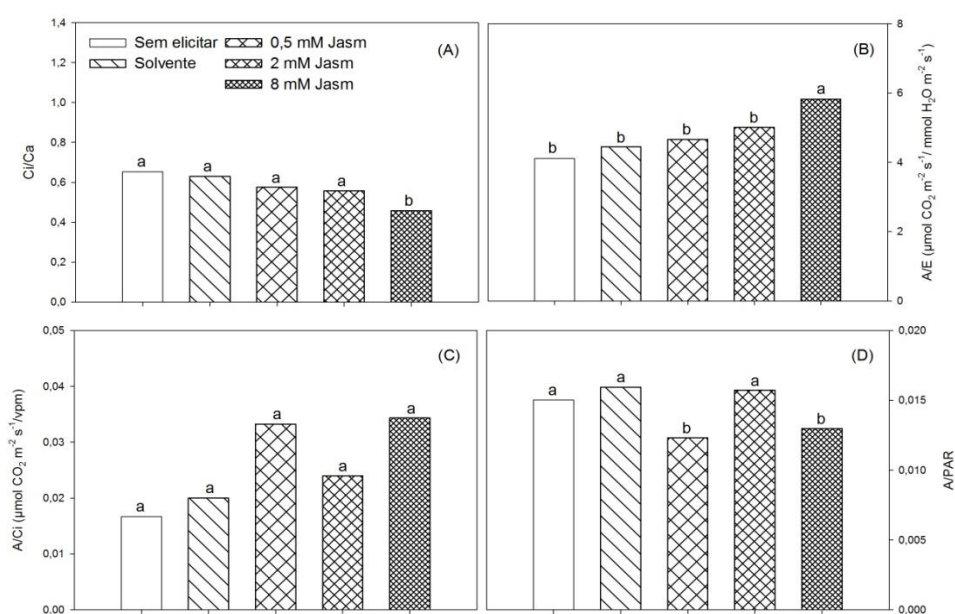


Gráfico 9 (A) A razão entre concentrações de CO_2 intra/extracelular (C_i/C_a), (B) A eficiência instantânea do uso da água (A/E), (C) A eficiência de carboxilação (A/C_i) e (D) A eficiência do uso da radiação (A/PAR), de folhas em desenvolvimento de *Piper mollicomum* após tratamento com jasmonato de metila a 0,5 mM, 2 mM e 8 mM, controle sem elicitar e somente com o solvente (*Tween 20* a 0,1%). Uma análise simples da variância foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos. Os resultados correspondem às médias de seis avaliações realizadas em triplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knot* a 5% de probabilidade.

A redução da condutância estomática não foi observada nas folhas completamente expandidas, contudo, nas folhas em desenvolvimento ocorreu redução nas plantas eliciadas em todas as concentrações. Diversos trabalhos relatam que o jasmonato de metila provoca fechamento estomático em várias espécies de plantas, de maneira semelhante ao ABA (SANZ et al., 1993; GEHRING et al., 1997; SUHITA et al., 2004; MUNEMASA et al., 2007; MUNEMASA et al., 2011; SAITO et al., 2008; HOSSAIN et al., 2011). Uma série de mensageiros são observados nas células-guarda e precedem o fechamento estomático, como a produção de ROS (SUHITA et al., 2004; MUNEMASA et al., 2007).

Nas folhas em desenvolvimento, apenas na maior concentração de jasmonato de metila foi observada redução no valor de C_i , na transpiração e nas relações C_i/C_a e A/PAR . Embora não tenha sido observada redução na fotossíntese, a menor condutância estomática acompanhada da diminuição no C_i poderia sugerir que a condutância estomática é o fator dominante, que limita a assimilação independentemente de qualquer deficiência metabólica (FLEXAS; MEDRANO, 2002).

No entanto, aumentou a relação A/E , o que sugere que a aplicação de jasmonato de metila a 8 mM otimiza a absorção de carbono em relação à perda de água.

Com relação ao acúmulo de biomassa, também não foram observadas diferenças estatísticas nas folhas e nem no caule após aplicação de jasmonato de metila (Gráfico 10). No entanto, para o sistema radicular, a aplicação de jasmonato de metila, independente da concentração, promoveu o maior acúmulo.

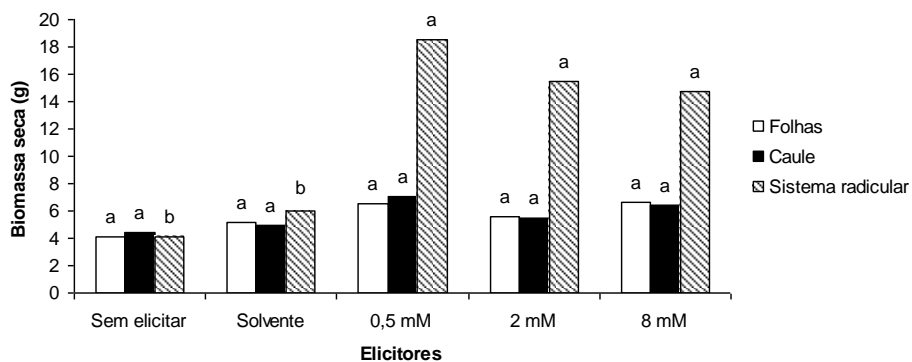


Gráfico 10 Alocação de biomassa em plantas de *Piper mollicomum* após aplicação de jasmonato de metila. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$), quando comparados os eliciadores em cada órgão analisado.

Ao contrário do observado neste ensaio, diversos autores relatam que o jasmonato de metila inibe o crescimento de raiz (STASWICK; SU; HOWELL, 1992; KIM et al., 2004; HORBOWICZ et al., 2011; RUIZ-MAY et al., 2011). No entanto, o efeito no crescimento da raiz parece ser dose dependente, mas é variável entre as espécies. Nas mudas de erva venenosa promoveu aumento em 10^{-6} e 10^{-7} M, mas inibiu em 10^{-5} M (DENG, 2005). Ao contrário do que ocorreu em trigo, concentrações elevadas (10^{-5} a 10^{-3}) inibiu o crescimento da raiz, enquanto que a baixa concentração (10^{-8} a 10^{-7}) aumentou (LIU et al., 2007b).

A inibição do crescimento de raízes é devido à desorganização celular e morte celular da coifa, bem como na perturbação da integridade da membrana mitocondrial e diminuição na biossíntese de ATP (RUIZ-MAY et al., 2011). Além disso, esses autores observaram alterações no acúmulo de várias proteínas envolvidas na energia e no metabolismo secundário, sugerindo uma mudança do destino metabólico que pode causar um aumento no acúmulo de metabolitos secundários.

Outros resultados promovido pelo jasmonato de metila no crescimento também foram observados em diversas espécies. Hejjari et al. (2005) relataram

que o diâmetro de mudas, além da biomassa fresca e comprimento de raízes foram prejudicadas pelo tratamento com jasmonato de metila. Em canola o crescimento de folhas e de raízes foi reduzido em 69% e 63% (ROSSATO et al., 2002). A aplicação de jasmonato de metila em soja promoveu redução da área foliar e na altura da planta, enquanto que aumentou o número de ramos (ANJUM et al., 2011). Por outro lado, a aplicação de jasmonato de metila promoveu o crescimento de artemísia, expressado pelo maior comprimento e biomassa seca da parte aérea (AFTAB et al., 2011).

4 CONCLUSÃO

A aplicação de quitosana reduziu as trocas gasosas de *Piper mollicomum* e as folhas em desenvolvimento são mais sensíveis à aplicação desse eliciador.

A aplicação de jasmonato de metila a 0,5 mM aumentou a eficiência fotossintética e eficiência instantânea do uso da água, independente do estágio de desenvolvimento da folha em *Piper mollicomum*.

Ambos os eliciadores promoveram o acúmulo de biomassa no sistema radicular e não influenciaram na parte aérea de *Piper mollicomum*.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M. R. et al. Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application. **European Journal of Scientific Research**, Seychelles, v. 39, n. 1, p. 170-177, Jan. 2010.

AFTAB, T. et al. Role of salicylic acid in promoting salt stress tolerance and enhanced artemisinin production in artemisia annua L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, n. 4, p. 425–435, Dec. 2011.

ANJUM, S. A. et al. Effect of exogenous methyl jasmonate on growth, gas exchange and chlorophyll contents of soybean subjected to drought. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 10 n. 47, p. 9640-9646, Aug. 2011.

ARZOLLA, F. A. R. D. P. et al. Regeneração natural em clareiras de origem antrópica na Serra da Cantareira, SP. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 155-169, 2010.

BARDELLI, K.. C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A. V. G. de. O gênero *Piper* L. (*Piperaceae*) da Mata Atlântica da Microbacia do sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 553- 561, abr. 2008.

BHATTACHARJEE, S. The language of reactive oxygen species signaling in plants. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1-22, 2012.

BITTELLI, M. et al. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Plant Physiology**, Washington, v. 107, n. 3, p. 167–175, Apr. 2001.

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

CARVALHO-OKANO, R. M. de; ALVES, S. A. M.. *Piperaceae* C. Agardh da estação experimental Mata do Paraíso, Viçosa, MG. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 12, n. 3, p. 497-513, 1998. Suplemento.

CHEN, H. P.; XU, L. L. Isolation and characterization of a novel chitosan-binding protein from non-heading chinese cabbage leaves. **Journal of Integrative Plant Biology**, Ney York, v. 47, n. 4, p. 452-456, Apr. 2005.

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

CORDOVA, S. M. de. et al. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p. 241-244, out./dez. 2010.

DENG, F. Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 82, n. 1, p. 16-26, May 2005.

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, Sept. 2008.

DUARTE, M. C. T. et al. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, nesp., p. 139- 143, 2006.

EL TANAHY, A. M. M. et al. Effect of Chitosan Doses and Nitrogen Sources on the Growth, Yield and Seed Quality of Cowpea. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Fuchu, v. 6, n. 4, p. 115-121, 2012.

EL-TANTAWY, E. M. Behavior of tomato plants as affected by spraying with chitosan and aminofort as natural stimulator substances under application of soil organic amendments. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Egypt, v. 12, n. 17, p. 1164-1173, 2009.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises estatísticas 4.3**. Lavras: UFLA, 1999.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitation revisited. **Annali di Botanica**, Roma, v. 89, p. 183–189, 2002.

GEHRING, C. A. et al. Jasmonates induce intracellular alkalization and closure of Paphiopedilum guard cells. **Annali di Botanica**, Roma, v. 80, p. 485–489, 1997.

GHONAME, A. A. et al. Enhancement of sweet pepper crop growth and production by application of biological, organic and nutritional solutions. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Cairo, v. 6, n. 3, p. 349-355, 2010.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. *Piperaceae* do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 1, p. 21-46, 2004.

GUIMARÃES, E. F.; MONTEIRO, D. *Piperaceae* na reserva biológica de poço das antas, silva jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 3, p. 567-587, 2006.

HARE, J. D. Variation in herbivore and methyl jasmonate-induced volatiles among genetic lines of datura wrightii. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 11, p. 2028-2043, Nov. 2007.

HEIJARI, J. et al. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Netherlands, v. 115, p. 117-124, 2005.

HORBOWICZ, M. et al. Effects of methyl jasmonate on accumulation of flavonoids in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Acta Biologica Hungarica**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 265-78, Sept. 2011.

HOSSAIN, M. A. et al. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in arabidopsis. **Plant Physiology**, Washington, v. 156, n. 1, 430–438, May 2011.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Reviews of Plant Biology**, Michigan, v. 59, p. 41-66, June 2008.

IRITI, M. et al. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 66, p. 493–500, 2009.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. **Photosynthetica**, Prague, v. 40, n. 4, p. 621–624, 2002.

KIM, Y. S. et al. Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 21, p. 1619-1622, Nov. 2004.

KIM, H. J. et al. Effect of chitosan on the biological properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 9, p. 3696-3701, Sept. 2005.

KHOKON, M. A. et al. Chitosan-induced stomatal closure accompanied by peroxidase-mediated reactive oxygen species production in *Arabidopsis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 74, n. 11, p. 2313-2315, Nov. 2010.

LAGO, J. H. G. et al. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (*PIPERACEAE*). **Quimica Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1222-1224, set./out. 2007.

LEE, S. L. et al. Oligogalaturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 121, n. 1, p. 147-152, Sept. 1999.

LEE, Y. S.; KIM, Y. H.; KIM, S. B. Changes in the respiration, growth, and vitamin C content of soybean sprouts in response to chitosan of different molecular weights. **HortScience**, Alexandria, v. 40, n. 5, p. 1333-1335, Oct. 2005.

LIU, Y. et al. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. **The Plant Journal**, New York, v. 51, n. 6, p. 941-954, Sept. 2007a.

LIU, Y. ZHAO, X.; LI, H. Inhibition of methyl jasmonate on root growth and antioxidative enzyme activities in wheat. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, China, v. 35, n. 4, p. 988-1006, Apr. 2007b.

MEDEIROS, M. F. T.; SENNA-VALLE, L. de; ANDREATA, R. H. P. **Flora medicinal dos sitiantes da reserva particular do patrimônio natural Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil: taxonomia e aspectos etnobotânicos**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2005.

MELO, A. C. G. de; DURIGAN, G. Evolução estrutural de reflorestamentos de restauração de matas ciliares no Médio Vale do Paranapanema. **Scientia Forestalis**, São Paulo, n. 73, p. 101-111, mar. 2007.

MONDAL, M. M. A. et al. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. **Australian Journal of Crop Science**, Austrália, v. 6, n. 5, p. 918-921, May 2012.

MUNEMASA, S. et al. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 155, n. 1, p. 553–561, Jan. 2011.

MUNEMASA, S. et al. The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in Arabidopsis guard cells: specific impairment of ion channel activation and second messenger production. **Plant Physiology**, Washington, v. 143, n. 3, p. 1398–1407, Mar. 2007.

MUZZARELLI, R. A. A. Some modified chitosans and their niche applications. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. **Chitin handbook**. Italy: Atec, 1997. p. 47-52.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy Review**, Erandwane, v. 1, n. 1, p. 69-79, Jan./May 2007.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 3, p. 1457-1465, 2003.

REIGADA, J. B. **Bioprospecção em espécies de Piperaceae**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROSSATO, L. et al. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 371, p. 1131-1141, May 2002.

RUIZ-MAY, E. et al. Methyl jasmonate induces ATP biosynthesis deficiency and accumulation of proteins related to secondary metabolism in *Catharanthus roseus* (L.) G. hairy roots. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 52, n. 8, p. 1401-1421, June 2011.

RUSCHEL, D. **O gênero Piper (Piperaceae) no Rio Grande do Sul**. 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SAITO, N. et al. Roles of RCN1, regulatory a subunit of protein phosphatase 2A, in methyl jasmonate signaling and signal crosstalk between methyl jasmonate and abscisic acid. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 49, n. 9, p. 1396–1401, July 2008.

SANZ, L. C. et al. Effect of methyl jasmonate on ethylene synthesis and stomatal closure in olive leaves. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 33, p. 285–289, 1993.

SASAKI, Y. et al. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **DNA Research**, Tokyo, v. 8, p. 153-161, July 2001.

SHEHATA, S. A.; FAWZY, Z. F.; EL-RAMADY, H. R. Response of Cucumber Plants to Foliar Application of Chitosan and Yeast under Greenhouse Conditions. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Fuchu, v. 6, n. 4, p. 63-71, 2012.

SHEIKHA, S. A. A. K.; AL-MALKI, F. M. Growth and Chlorophyll Responses of Bean Plants to the Chitosan Applications. **European Journal of Scientific Research**, Seychelles, v. 50, n. 1, p. 124-134, Jan. 2011.

SRIVASTAVA, N. et al. Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. **Planta**, Hyderabad, v. 229, n. 4, p. 757-765, Mar. 2009.

STASWICK, P. E.; SU, W. P.; HOWELL, S. H. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 89, n. 5, p. 6837-6840, Aug. 1992.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. 4 ed. Cary: SAS Institute, 1990.

SUHITA, D. et al. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, n. 4, p. 1536-1545, Apr. 2004.

UTHAIRATANAKIJ, A.; SILVA, J. A. T. da; OBSUWAN, K. Chitosan for improving orchid production and quality. **Orchid Science and Biotechnology**, Cheng Kung, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2007.

WASTERNAK, C.; PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 8, p. 302-307, Aug. 1997.

**CAPÍTULO 4 Ação de eliciadores na estrutura e ultraestrutura do limbo
foliar de *Piper mollicomum* Kunth**

1 INTRODUÇÃO

Dentre as *Piperaceae*, *Piper mollicomum*, conhecida popularmente como jaborandi, que embora ainda não seja cultivada comercialmente, possui potencial devido à sua utilidade como medicinal. Possui ação comprovada como antibacteriana (CORDOVA et al., 2010) e antifúngica (LAGO et al., 2007; REIGADA, 2009) e é bastante utilizada na medicina popular para diversos fins (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; MEDEIROS et al., 2002; BRITO; SENNA-VALLE, 2011). É produtora de óleo essencial de elevado rendimento e moderada ação antibacteriana (DUARTE et al., 2006).

Durante o seu desenvolvimento, as plantas são expostas constantemente a diversas situações extressantes de natureza biótica (insetos, vírus, bactérias e fungos) ou abiótica (radiação ultravioleta, salinidade, temperatura, umidade, metais pesados, dentre outros). Quitosana e jasmonato de metila se destacam como compostos sinalizadores de respostas de defesa sistêmica na interação entre a planta e o patógeno.

Quitosana é um biopolímero hidrofílico formado por moléculas de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (RABEA et al., 2003). É o elemento estrutural do exoesqueleto de insetos e crustáceos (MUZZARELLI, 1997) e encontrado nas paredes celulares de uma variedade de fungos (BITTELLI et al., 2001). A quitosana é liberada pela ação de enzimas das plantas em paredes celulares microbianas (NAMDEO, 2007) e o mecanismo de ação envolve a sua ligação a receptores presentes na membrana celular (CHEN; XU, 2005).

O jasmonato de metila é o metil éster do fito-hormônio ácido jasmônico e caracteriza-se por conter um anel de ciclopentanona com uma cadeia pentenil inserida no C7, um grupo carbonila no C6 e um acetil metilado no C3

(WASTERACK; PARTHIER, 1997). É biossintetizado pela via do ácido linoleico, pela rota octadecanoide durante a fragmentação da membrana plasmática (SASAKI et al., 2001; HOWE; JANDER, 2010). É produzido em resposta aos ferimentos causados por herbívoros e patógenos especialmente os necrotróficos (BROWSE, 2009).

As plantas desenvolveram mecanismos de resposta às injúrias causadas por agentes bióticos e abióticos (CORRÊA et al., 2008). As defesas são classificadas em químicas, incluindo diversas substâncias tóxicas, repelentes ou que dificultam a digestibilidade do tecido vegetal pelo animal; e físicas, relacionadas à superfície foliar, especialmente os tricomas e a cutícula (HARBONE, 1988; MELO; SILVA FILHO, 2002).

A cutícula é uma modificação da parede celular da epiderme, que constitui uma barreira de permeabilidade funcional, que impede a perda de água excessiva e a entrada de substâncias nocivas e agentes patogênicos (REINAPINTO; YEPHREMOV, 2009). A dureza da folha implica em paredes espessadas e/ou feixes de fibras, lignificadas ou não (PEETERS, 2002; FERNANDES, 1994). Uma epiderme com textura rígida, por deposição de sílica e/ou lignina, é uma barreira mecânica que reduz a oviposição por alguns insetos (LARA, 1991). O número de camadas do mesofilo contribui para a espessura foliar e o desenvolvimento de esclerênquima, além de hipoderme com células de parede espessada, lignificada ou não, confere maior dureza à folha (EDWARDS; WRATTEN, 1981; PEETERS, 2002; WEI et al., 2000).

Os tricomas podem contribuir para a defesa da planta em diferentes maneiras, sendo uma importante linha de defesa contra insetos herbívoros e patógenos (GLAS et al., 2012). Os tricomas glandulares acumulam ácidos, terpenos, gomas e/ou taninos, podendo ser tóxico ou promover repelência, enquanto que os tectores podem constituir uma barreira física (CORRÊA et al., 2008). A densidade dos tricomas glandulares (Boughton et al., 2005) e de

tricomas tectores (KOBAYASHI; YANAKA; IKEDA, 2010) aumentam após aplicação de jasmonato de metila.

Outras estruturas acumuladoras de metabólitos secundários também podem ser estimuladas pelo jasmonato de metila, como ductos de resina em espécies de gimnospermas (FRANCESCHI; KREKLING; CHRISTIANSEN, 2002; HUDGINS; CHRISTIANSEN; FRANCESCHI, 2003; HUDGINS; CHRISTIANSEN; FRANCESCHI, 2004; MARTIN et al., 2002; HEIJARI et al., 2005; HUBER et al., 2005).

Defesas estruturais podem ser induzidas por jasmonato de metila (ROHWER; ERWIN, 2008; FAROUK; OSMAN, 2011). Modificações ultraestruturais são evidenciadas pela aplicação de quitosana (NAGORSKAYA et al., 2012) e de jasmonato de metila (RANGEL et al., 2002; ZHANG; XING, 2008).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho, avaliar a influência da aplicação de diferentes concentrações de quitosana e jasmonato de metila sobre as características estruturais e ultraestruturais da folha de *Piper mollicomum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Etapa 1 - Obtenção das mudas

As mudas foram obtidas no Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA. Sementes de *P. mollicomum* foram pré-germinadas em placas de petri sobre três folhas de papel de filtro e mantidas em câmara de germinação do tipo *Mangesdorf* durante 30 dias. As plântulas foram transferidas para bandejas de polipropileno expandido de 72 células, contendo substrato organo-mineral e mantidas em sala de crescimento por 60 dias para o estabelecimento da muda. A sala de crescimento foi programada para apresentar um fotoperíodo de 12 h, radiação incidente de $300 \mu\text{mol de quanta. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, umidade relativa ao redor de 60% e regime térmico de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após esse período, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de 6 L de substrato (terra de subsolo, areia e esterco bovino, na proporção de 2:1:1) e mantidas em casa de vegetação por 4 meses, sob 50% de sombreamento, utilizando telas pretas, até a submissão dos tratamentos com eliciadores, momento em que as plantas estavam no estágio de florescimento. O ensaio foi conduzido em delineamento blocos casualizados.

Etapa 2 - Elicitação

A quitosana utilizada possui 85% de desacetilação e apresenta fórmula molecular $(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$. As concentrações foram de 2,5; 5 e 10 g L^{-1} , cujas soluções foram preparadas, conforme metodologia descrita por Di Piero e Garda (2008), pela dissolução em ácido clorídrico a 0,05 N com agitação constante e correção do pH para 5,5 com hidróxido de sódio. Como controle foi utilizado plantas não pulverizadas e plantas pulverizadas apenas com o solvente. Em cada

planta foram pulverizadas 200 mL da solução de quitosana, em toda a parte aérea.

O jasmonato de metila foi utilizado nas concentrações de 0,5; 2,0 e 8 mM, preparada solubilizando-se o produto comercial em *Tween* 20 a 0,1%, conforme Hare (2007). Como controle foram utilizadas plantas não submetidas à aplicação de jasmonato de metila e plantas pulverizadas apenas com o solvente. Em cada planta foram pulverizadas 100 mL das soluções, de maneira a umedecer completamente toda a parte aérea, inclusive ambas as superfícies foliares.

Etapa 3 - Obtenção das variáveis

Foram analisadas folhas completamente expandidas, inseridas no terceiro ou quarto nó, coletadas 28 dias após a aplicação das soluções. De cada tratamento foram analisadas cinco plantas, sendo coletada uma folha de cada, que corresponderam às repetições. De cada folha foram obtidas quatro seções que corresponderam à parcela de cada repetição, totalizando 20 medições. As medições e contagens foram realizadas no programa computacional *Image to*.

As avaliações estruturais por microscopia óptica foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia/UFLA e as análises de microscopia eletrônica de transmissão (ultraestruturais), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia/UFLA.

Microscopia de luz

As folhas foram conservadas em etanol 70%. As seções transversais foram obtidas em micrótomo de mesa, a partir de fragmentos de 0,5 cm²,

retirados da região mediana do limbo foliar, clarificadas em solução de hipoclorito de sódio a 50%, lavadas em água destilada, coradas com safra-blau e montadas em glicerina 50%, para medições dos tecidos do limbo foliar (KRAUS; ARDUIN, 1997).

As seções paradérmicas foram obtidas por dissociação ácida, a partir de fragmentos de 0,5 cm², retirados da região mediana do limbo foliar, descartando-se a nervura central, clarificadas em solução 50% de hipoclorito de sódio, lavadas em água destilada, coradas com safranina a 0,5% e montadas em glicerina 50%, para contagem e medições dos estômatos.

Microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização anatômica por meio de microscopia eletrônica de varredura, fragmentos da região mediana do limbo foram coletados e fixados em *Karnovsky* modificado - Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001 M. Esses foram armazenados nessa solução por um mês em geladeira. Os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2h, desidratadas em gradiente progressivo de acetona, submetidos à secagem ao ponto crítico (BAL-TEC, modelo CPD-030, *Principality of Liechtenstein*), montadas em *stubs* de alumínio com fita dupla-face e metalizados em evaporador de ouro *Sputtering* (BAL-TEC, modelo SCD-050, *Principality of Liechtenstein*).

Foram quantificados o número de tricomas tectores e glandulares das superfícies abaxiais e adaxiais do limbo foliar.

Microscopia eletrônica de transmissão

Da mesma folha coletada para as análises em microscopia de luz foram retirados fragmentos de 0,5 cm² da região mediana do limbo foliar e imersos em solução fixadora [2,5% glutaraldeído e 2,5% paraformaldeído em tampão cacodilato 0,05M (pH 7,0) + CaCl₂ 0,001M], lavados em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 minutos) e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05M por 1-2 horas. Em seguida, foi desidratado em gradiente de acetona (30, 50, 70, 90 por 10 minutos e três vezes de 10 minutos em 100%). Logo após, o material foi incluído em gradiente crescente de acetona e resina *Spurr* 30% por 8 horas, 70% por 12 horas e 100%, duas vezes por 24 horas cada, e polimerizado em estufa a 70°C, por 48 horas. Foram obtidas seções semifinas (0,85 µm) e ultrafinas (<100nm) usando-se um ultramicrotomo *Reichert-jung (ultracut)*, com navalha de diamante. Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina (1g de azul de toluidina, 1g de borato de sódio e montados permanentemente em meio *Permalt*. Os cortes ultrafinos foram pós-contrastados em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por três minutos cada, e, em seguida, examinados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kv.

Foram avaliadas as características ultraestruturais dos cloroplastos e mitocôndrias, quanto à morfologia, dimensão, distribuição e quantidade, bem como a presença, o tamanho e morfologia de grãos de amido. Também foram avaliadas as características da parede celular, das epidermes, do parênquima paliçádico e, ainda, das estruturas responsáveis pela produção dos fenilpropanoides (cavidades secretoras e tricomas glandulares).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência do jasmonato de metila

Não foram observadas diferenças estatísticas na espessura das epidermes abaxial e adaxial, das camadas subcelular adaxial e da abaxial, da cutícula adaxial e da espessura total do limbo foliar (Tabela 5). A espessura da cutícula abaxial e do mesofilo foram superiores nas plantas eliciadas com jasmonato de metila, independente da concentração aplicada, quando comparadas com os controles (solvente e plantas não eliciadas).

Tabela 5 Características da secção transversal do limbo foliar de *Piper mollicomum* após a aplicação de jasmonato de metila, expressa em μm . Legenda: Trat.: tratamentos; Cut. Ab.: cutícula abaxial; Ep. Ab.: epiderme abaxial; C. S. ab.: camada subcelular abaxial; Mes.: mesofilo; Ep. Ad.: epiderme adaxial; Cut. Ad.: cutícula adaxial; Esp. Total: espessura total

Trat.	Cut. Ab.	Ep. Ab.	C. S. Ab.	mes.	Ep. Ad.	Cut. Ad.	Esp. Total
Sem elicitar	5,71 b	15,24 a	15,01 a	70,47 b	23,04 a	6,09 a	120,35 a
Solvente	5,22 b	17,01 a	15,14 a	70,09 b	23,40 a	5,80 a	118,74 a
0,5 mM	6,52 a	17,37 a	14,61 a	75,65 a	23,93 a	6,83 a	125,25 a
2 mM	6,11 a	15,88 a	15,25 a	75,60 a	21,85 a	6,39 a	122,02 a
8 mM	6,26 a	15,96 a	15,65 a	73,48 a	23,32 a	6,63 a	124,76 a
CV (%)	9,65	9,02	8,13	3,85	8,55	14,45	2,61

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de *Scott Knott* ($p < 0,05$).

O aumento da espessura da cutícula após aplicação de jasmonato de metila tem uma forte correlação com a sua função na interação planta-patógeno. A cutícula parece ser uma barreira eficiente contra a maioria dos patógenos que colonizam a superfície da planta e, não é simplesmente uma barreira física, mas

uma defesa química dinâmica com circuitos de sinalização e moléculas efectoras (REINA-PINTO; YEPHREMOV, 2009). Dando suporte aos resultados encontrados neste ensaio, Pinot et al. (1998) e Kandel et al. (2007), verificaram que a aplicação de jasmonato de metila estimulou em 14 a 16 vezes, respectivamente, uma enzima-chave na síntese da cutícula.

Outro resultado observado neste ensaio foi que a aplicação do jasmonato de metila aumentou a espessura do mesofilo. Esse aumento é explicado pela função desse tecido na interação planta-patógeno, uma vez que o número de camadas do mesofilo contribui para a espessura foliar e confere maior dureza à folha, podendo retardar a colonização ou dificultar a predação por insetos herbívoros (EDWARDS; WRATTEN, 1981; FERNANDES, 1994; WEI et al., 2000; PEETERS, 2002).

Corroborando com os resultados obtidos nesse ensaio, em feijão a aplicação de jasmonato de metila promoveu aumento da espessura da lâmina foliar, que coincidiu com o aumento da espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, bem como a da epiderme abaxial e adaxial (FAROUK; OSMAN, 2011).

Foram observados tricomas tectores e glandulares na superfície adaxial (Figura 6).

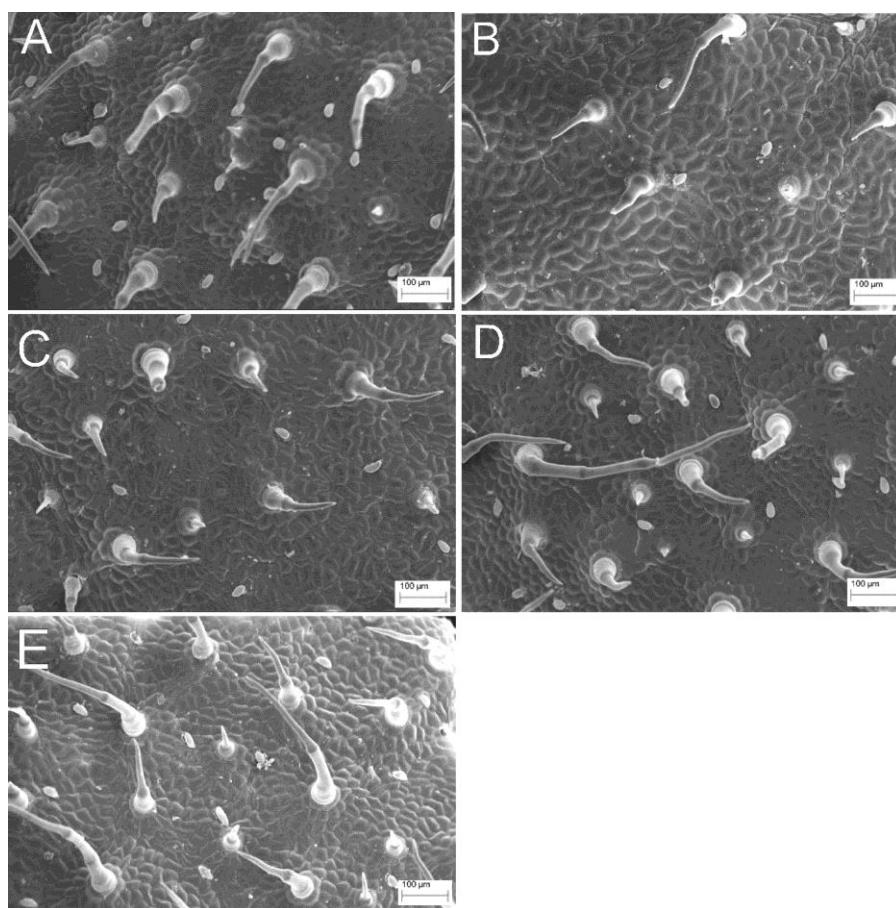


Figura 6 Eletromicrografias de varredura das superfícies adaxial do limbo foliar de *Piper mollicomum*. A- Sem aplicação de eliciadores. B- Solvente. C- 0,5 mM de jasmonato de metila. D- 2 mM de jasmonato de metila. E- 8 mM de jasmonato de metila

Na superfície abaxial também foi observado tricomas tectores e glandulares, no entanto em maior abundância (Figura 7).

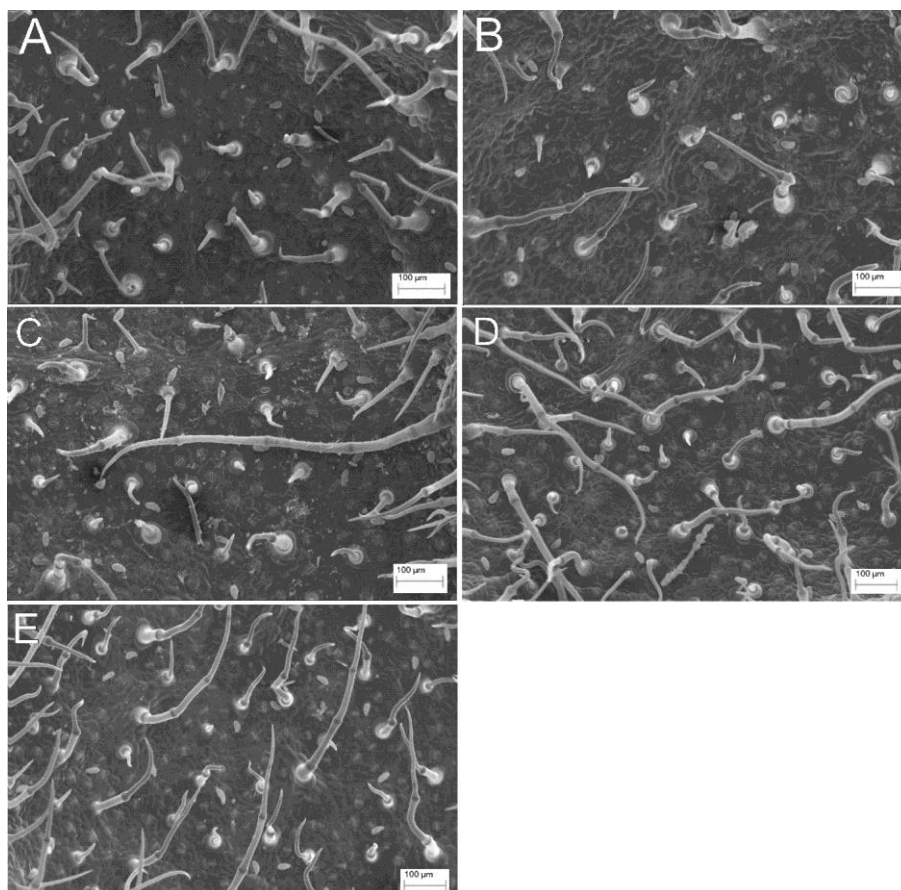


Figura 17 Eletromicrografias de varredura das superfícies abaxial do limbo foliar de *Piper mollicomum*. A- Sem aplicação de eliciadores. B- Solvente. C- 0,5 mM de jasmonato de metila. D- 2 mM de jasmonato de metila. E- 8 mM de jasmonato de metila

A aplicação de jasmonato de metila não influenciou no número de tricomas na superfície adaxial (Tabela 6). Na superfície abaxial foi observada uma redução no número de tricomas glandulares em relação às plantas sem elicitar. O número de tricomas tectores foi maior nas plantas eliciadas com 2 mM de jasmonato de metila, seguida das plantas sem elicitar e menor nos demais tratamentos, que não diferiram entre si.

Tabela 6 Características da seção paradérmica do limbo foliar de *Piper mollicomum* após a aplicação de jasmonato de metila. Os valores correspondem à contagem em uma área de 622 mm. Legenda: Trat.: tratamentos

Trat.	Adaxial		Abaxial	
	Tricomas glandulares	Tricomas tectores	Tricomas glandulares	Tricomas tectores
Sem elicitar	12 a	14 a	23 a	43 b
Solvente	11 a	14 a	13 b	38 c
0,5 mM	11 a	14 a	14 b	38 c
2 mM	11 a	16 a	15 b	54 a
8 mM	12 a	14 a	16 b	34 c
CV (%)	10,43	16,34	9,94	7,41

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de *Scott Knott* ($p < 0,05$).

Os tricomas podem contribuir para a defesa da planta em diferentes maneiras, sendo uma importante linha de defesa contra insetos herbívoros e patógenos (GLAS et al., 2012). Os tricomas glandulares acumulam ácidos, terpenos, gomas e/ou taninos, podendo ser tóxico ou promover repelência, enquanto que os tectores podem constituir uma barreira física (CORRÊA et al., 2008).

Neste ensaio, foi observada uma redução de quase 50% no número de tricomas glandulares em função da aplicação de jasmonato de metila, inclusive pelo solvente (Tabela 6). Ao contrário do observado nesse ensaio, a densidade dos tricomas glandulares aumenta após aplicação de jasmonato de metila em tomate (BOUGHTON; HOOVER; FELTON, 2005).

No entanto, observa-se que os tricomas tectores aumentaram em cerca de 26% após a aplicação de 2 mM de jasmonato de metila, em relação as plantas sem elicitar (Tabela 6). Corroborando com os resultados encontrados neste ensaio, em capim-de-*rhodes*, a aplicação de jasmonato de metila aumenta a densidade e altera a iniciação dos tricomas (número/1000 células epidérmicas), aumentando a iniciação dos tricomas longos mas reduzindo das glândulas sal (KOBAYASHI; YANAKA; IKEDA, 2010).

Com relação à ultraestrutura, pode ser observado que nas plantas sem elicitar foram evidenciados diversas organelas, como o núcleo com o nucléolo evidente, vacúolo, parede celular definida, cloroplastos com enormes granulos de amido e acúmulo de material eletrodenso no citosol (Figura 8A). Foram observados plastoglóbulos no interior de cloroplastos (Figura 8B). Os cloroplastos possuem grana evidente e as mitocôndrias são bem desenvolvidas (Figura 8C e D).

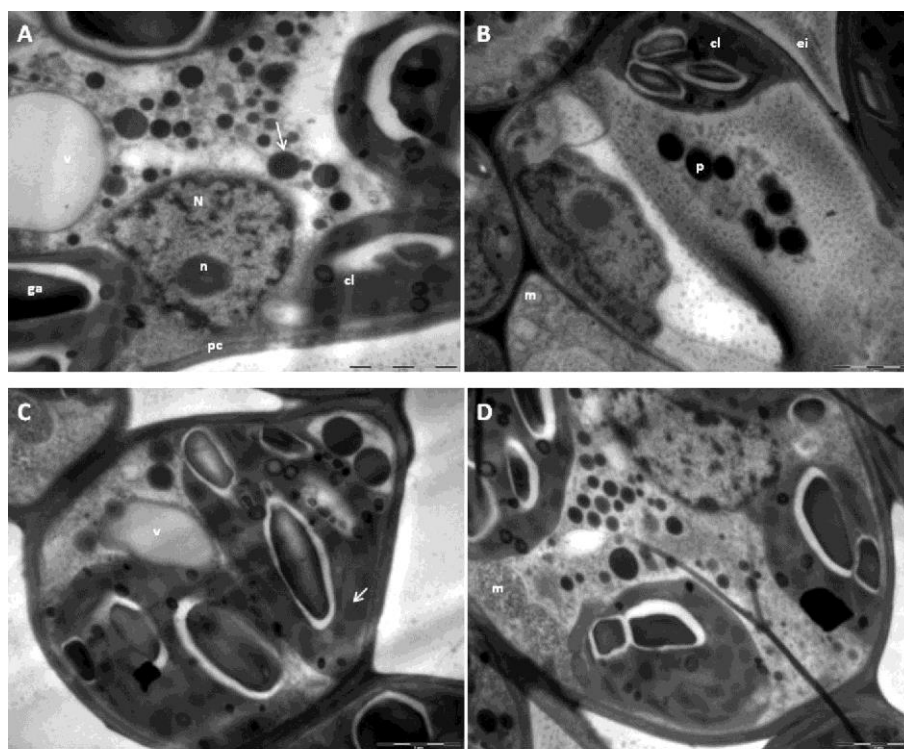


Figura 8 Eletromicrografias de transmissão de seções transversais do parênquima paliádico de *P. mollicomum*. Legenda: N- núcleo; n- nucléolo; cl- cloroplasto; ga- grão de amido; pc- parede celular; v- vacúolo; p- plastoglóbulo; ei- espaço intercelular. Em (A) a seta evidencia o acúmulo de material eletrodenso no citosol e em (C) as grana do cloroplasto

As plantas submetidas à aplicação do solvente e do jasmonato de metila a 0,5 mM e 2 mM apresentaram organelas com aspecto aparentemente normal em relação ao controle sem elicitar (Figuras 9A-C). No entanto, as plantas pulverizadas com 8 mM de jasmonato de metila apresentaram algumas modificações, como vacuolização mais intensa (Figura 9D), aumento da sinuosidade da parede celular e cloroplasto com redução de grana (Figura 9E e F) e redução na distribuição das mitocôndrias.

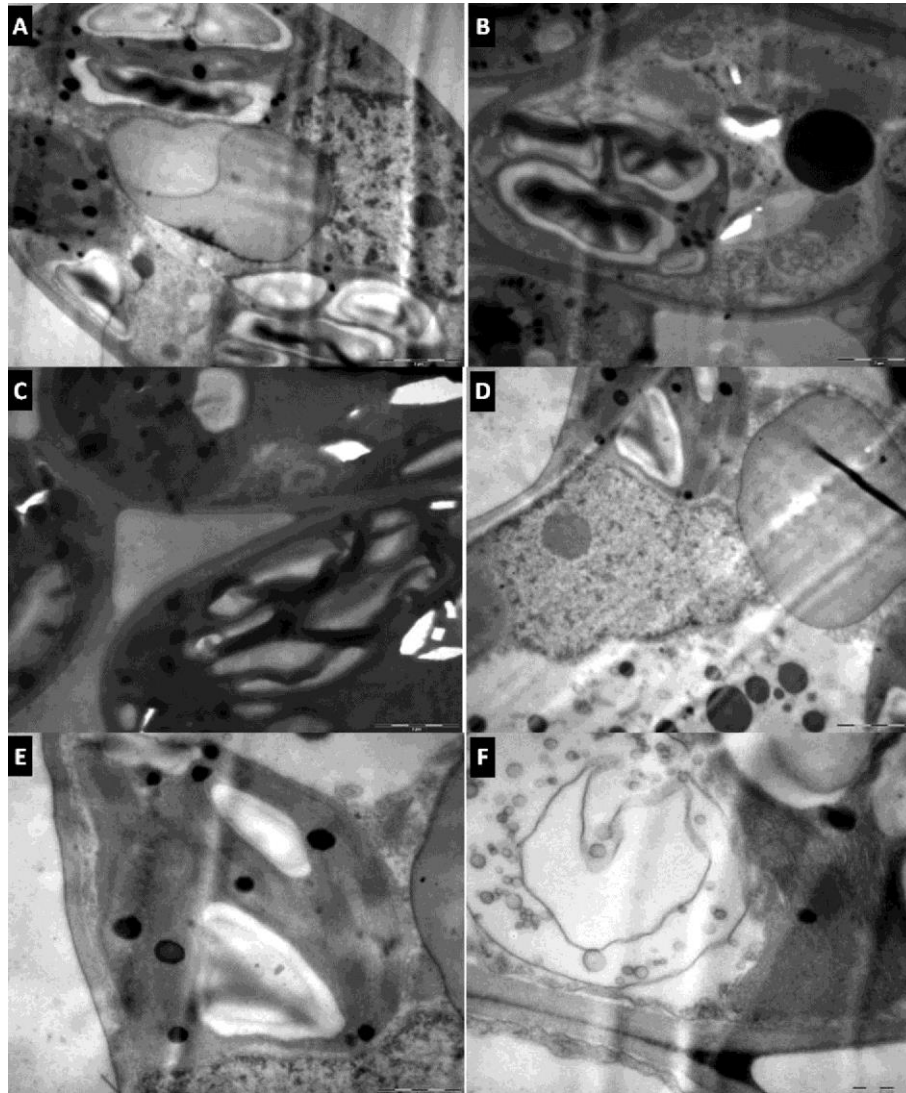


Figura 9 Eletromicrografias de transmissão de seções transversais do parênquima paliádico de *P. mollicomum* após tratamento com jasmonato de metila. A- Pulverizada com o solvente (*Tween* 20 a 0,1%). B- Pulverizada com jasmonato de metila a 0,5 mM. C- Pulverizada com jasmonato de metila a 2 mM. D, E e F- Pulverizada com jasmonato de metila a 8 mM

Correlacionando com os resultados observados neste ensaio, em maracujá, a exposição ao jasmonato de metila causou modificação nos cloroplastos, uma vez que o estroma e o grana das membranas tilacoides tornaram-se desorganizados (RANGEL et al., 2002). Provavelmente, essas modificações foram a causa da redução na eficiência do uso da radiação observada no capítulo 3.

Zhang e Xing (2008) demonstraram que dependendo da concentração aplicada no vegetal, o jasmonato de metila induz a produção de espécies reativas de oxigênio, causa uma série de modificações na dinâmica mitocondrial incluindo sua distribuição, diminui o potencial transmembrana, provoca severas modificações ultraestruturais em organelas celulares e declínio da eficiência fotoquímica e da taxa de crescimento vegetal.

3.2 Influência da quitosana

A aplicação da quitosana não influenciou nas características estruturais da secção transversal do limbo foliar (Tabela 7).

Tabela 7 Características da secção transversal do limbo foliar de *Piper mollicomum* após a aplicação de quitosana (g L^{-1}), expressa em μm . Legenda: Trat.: tratamentos; Cut. Ab.: cutícula abaxial; Ep. Ab.: epiderme abaxial; C. S. ab.: camada subcelular abaxial; Mes.: mesofilo; Ep. Ad.: epiderme adaxial; Cut. Ad.: cutícula adaxial; Esp. Total: espessura total

Trat.	Cut. Ab.	Ep. Ab.	C. S. Ab.	mes.	Ep. Ad.	Cut. Ad.	Esp. Total
Sem elicitar	5,71 a	15,24 a	15,01 a	70,47 a	23,04 a	6,09 a	120,35 a
Solvente	5,54 a	16,46 a	15,29 a	73,72 a	21,90 a	6,24 a	124,18 a
2,50	6,11 a	17,21 a	15,67 a	75,92 a	22,52 a	6,25 a	124,64 a
5	5,83 a	16,07 a	14,87 a	73,13 a	23,33 a	6,85 a	121,72 a
10	6,50 a	16,45 a	14,71 a	77,39 a	23,24 a	7,00 a	127,39 a
CV (%)	11,18	8,26	6,1	6,44	9,01	10,97	4,31

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de *Scott Knott* ($p < 0,05$)

As plantas eliciadas com quitosana, na concentração de 5 e de 10 g L^{-1} , apresentaram uma camada que recobria ambas as superfícies, sendo mais densa na maior concentração (Figura 10).

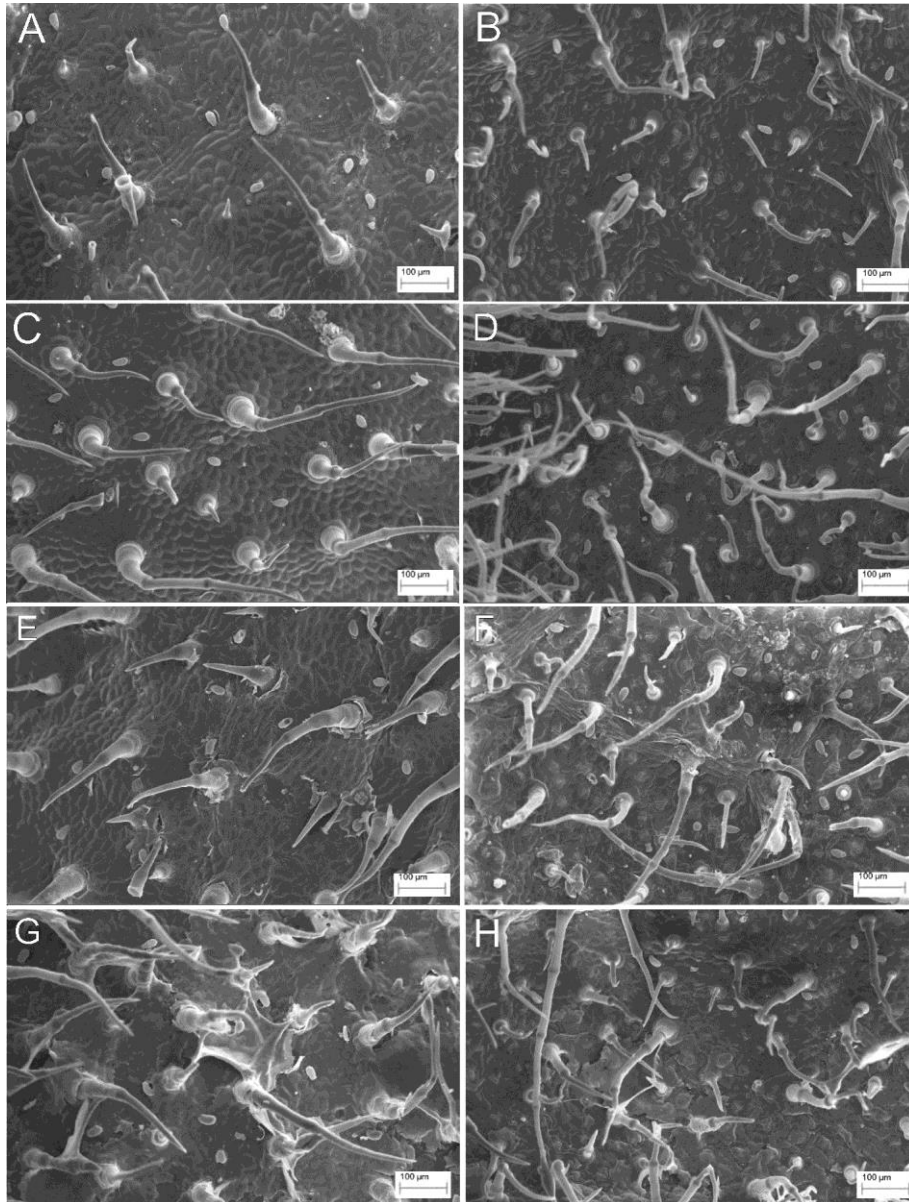


Figura 10 Eletromicrografias de varreduradas superfícies adaxial (A, C, E e G) e abaxial (B, D, F e H) do limbo foliar de *Piper mollicomum*. A e B- Solvente. C e D- 2,5 g L⁻¹ de quitosana. E e F- 5 g L⁻¹ de quitosana. G e H- 10 g L⁻¹ de quitosana

Na superfície adaxial o número de tricomas glandulares foi menor nas plantas pulverizadas com a maior concentração de quitosana e maior nos demais tratamentos, que não diferiram entre si (Tabela 8). Os tricomas tetores na superfície adaxial estiveram em maior número nas plantas eliciadas com a 2,5 g L⁻¹ de quitosana e em menor com 10 g L⁻¹. Na superfície abaxial os tricomas glandulares foram superiores nas plantas sem elicitar e inferiores nas pulverizadas com a maior concentração de quitosana. O maior número de tricomas tetores na superfície abaxial foi observado nas plantas sem elicitar e nas pulverizadas com 2,5 g L⁻¹ de quitosana, seguido dos demais tratamentos, que não diferiram entre si.

Tabela 8 Características da secção paradérmica do limbo foliar de *Piper mollicomum* após a aplicação de quitosana (g L⁻¹). Os valores correspondem à contagem em uma área de 622 mm. Legenda: Trat.: tratamentos

Trat.	Adaxial		Abaxial	
	Tricomas glandulares	Tricomas tectores	Tricomas glandulares	Tricomas tectores
Sem elicitar	12 a	14 b	23 a	43 a
Solvente	13 a	14 b	17 b	31 b
2,50	12 a	17 a	15 b	38 a
5	11 a	14 b	12 b	32 b
10	7 b	9 c	8 c	29 b
CV (%)	11,61	11,95	14,04	9,75

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de *Scott Knott* ($p < 0,05$).

Na maior concentração de quitosana houve uma redução acentuada no número de tricomas glandulares e tectores na superfície adaxial e de tricomas glandulares na superfície abaxial. Essa redução pode acarretar em menor tolerância aos estresses ambientais, uma vez que os tricomas podem contribuir

para a defesa da planta em diferentes maneiras, sendo uma importante linha de defesa contra insetos herbívoros e patógenos (GLAS et al., 2012).

No entanto, a menor concentração de quitosana estimulou o desenvolvimento de tricomas tectores na superfície adaxial. Esse aumento pode vir a constituir um mecanismo de adaptação aos estresses bióticos sinalizados pela quitosana. Tricomas tectores são muito importantes na defesa contra insetos herbívoros uma vez que dificultam a locomoção sobre a superfície foliar, funcionando como obstáculo ou mesmo aprisionando ou causando a sua morte (CORRÊA et al., 2008).

As plantas submetidas à aplicação do solvente e da quitosana a $2,5 \text{ g L}^{-1}$ apresentaram organelas com aspecto aparentemente normal em relação ao controle sem elicitar (Figuras 11A-C).

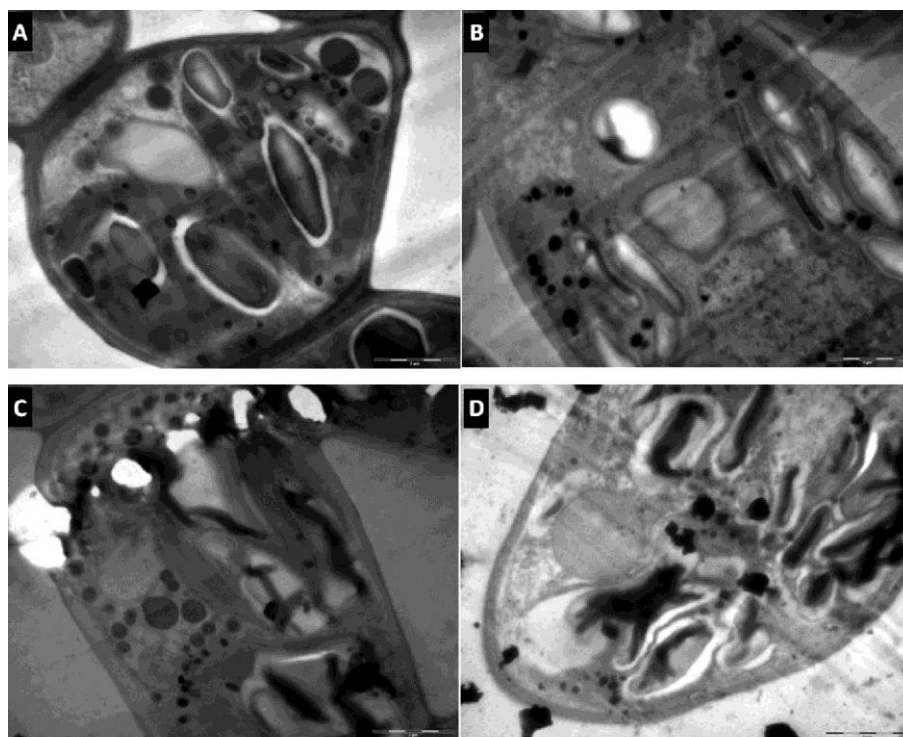


Figura 11 Eletromicrografias de transmissão de seções transversais do parênquima paliçádico de *P. mollicomum* após tratamento com quitosana. A - controle sem elicitar. B - Pulverizada com o solvente (ácido clorídrico a 0,05N). C - Pulverizada com quitosana a 2,5 g L⁻¹. D - Pulverizada com quitosana a 5 g L⁻¹.

No entanto, nas plantas pulverizadas com 5 g L⁻¹ de quitosana apresentaram algumas modificações, principalmente nos cloroplastos como desintegração e ruptura de membranas tilacoides (Figura 11D).

Nas plantas pulverizadas com quitosana a 10 g L⁻¹ o dano na ultraestrutura foi acentuado (Figura 12A-D). Foi observado vacuolização intensa, retração e surgimento de invaginações na membrana plasmática, colapso do citoplasma com o desaparecimento de organelas como mitocôndrias e cloroplastos, indicando o surgimento de morte celular.

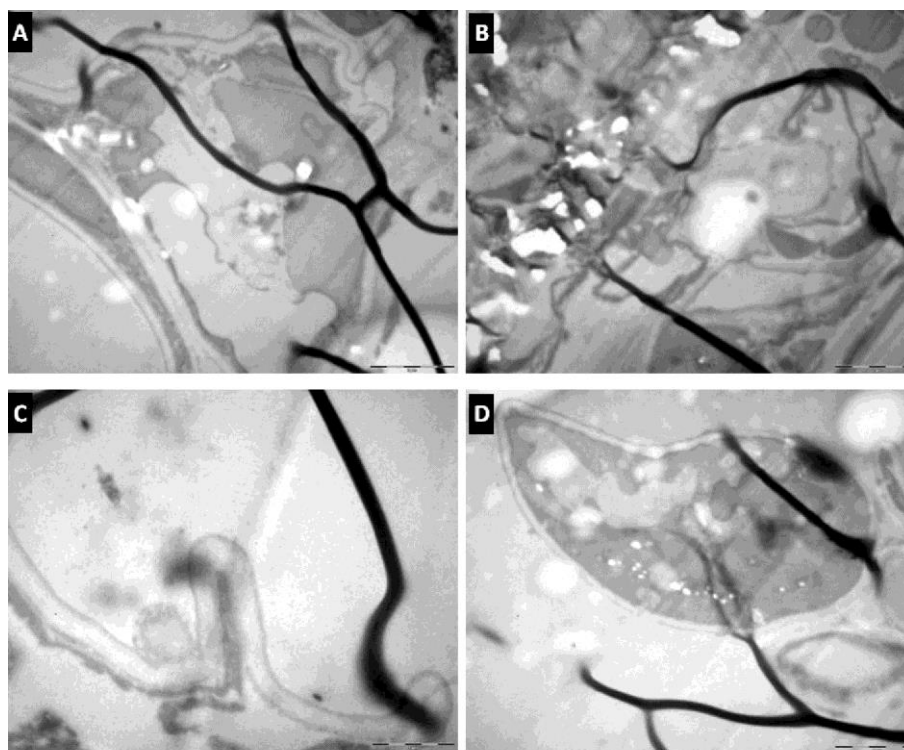


Figura 12 Eletromicrografias de transmissão de seções transversais do parênquima paliádico de *P. mollicomum* após tratamento com quitosana a 10 g L⁻¹.

Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, em células do mesofilo de tabaco a quitosana causou consideráveis modificações destrutivas, como a condensação da cromatina nuclear e o colapso do citoplasma, que podem ser classificadas como um resultado do desenvolvimento de morte celular programada. Esses autores observaram que em algumas células a quitosana estimulou o aparelho de síntese proteica e ao mesmo tempo, causou ativação do compartimento lítico (NAGORSKAYA et al., 2012).

4 CONCLUSÃO

A aplicação de jasmonato de metila induz modificações estruturais que podem constituir vantagens na interação planta-patógeno ou planta-herbívoro.

A quitosana a 10 g L^{-1} causou modificações na célula que podem ser classificadas como um resultado do desenvolvimento de morte celular programada.

REFERENCIAS

- BITTELLI, M. et al. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Plant Physiology**, Washington, v. 107, n. 3, p. 167–175, Apr. 2001.
- BOUGHTON, A. J.; HOOVER, K.; FELTON, G. W. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 9, p. 2211–2216, Sept. 2005.
- BRITO, M. R. de; SENNA-VALLE, L. de. Plantas medicinais utilizadas na comunidade caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 25, n. 2, p. 363-372, abr./jun. 2011.
- BROWSE, J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 183-205, June 2009.
- CHEN, H. P.; XU, L. L. Isolation and characterization of a novel chitosan-binding protein from non-heading chinese cabbage leaves. **Journal of Integrative Plant Biology**, Ney York, v. 47, n. 4, p. 452-456, Apr. 2005.
- CORDOVA, S. M. de. et al. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p. 241-244, out./dez. 2010.
- CORRÊA, P. G. et al. Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 3, p. 54-57, set. 2008.
- DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, set. 2008.

DUARTE, M. C. T. et al. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec Escherichia coli. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, nesp., p. 139- 143, 2006.

EDWARDS, P. J.; WRATTEN, S. D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. São Paulo: EPU, 1981.

FAROUK, S.; OSMAN, M. A. The effect of plant defense elicitors on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield in absence or presence of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) infestation. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, Michigan, v. 7, n. 3, p. 05-22, 2011.

FERNANDES, G. W. “Plant mechanical defenses against insect herbivory”. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 421-433, fev. 1994.

FRANCESCHI, V. R.; KREKLING, T.; CHRISTIANSEN, E. Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense-related responses in phloem and xylem. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 89, n. 4578, p. 578-586, Apr. 2002.

GLAS, J. J. et al. plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, Bethesda, v. 13, n. 12, p. 17077-17103, Dec. 2012.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. *Piperaceae* do nordeste brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 1, p. 21-46, 2004.

HARBONE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic Press, 1988.

HARE, J. D. Variation in herbivore and methyl jasmonate-induced volatiles among genetic lines of *Datura wrightii*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 11, p. 2028-2043, Nov. 2007.

HEIJARI, J. et al. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 117-124, 2005.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Reviews of Plant Biology**, Michigan, v. 59, p. 41-66, June 2008.

HUBER, D. P. W. et al. Changes in anatomy and terpene chemistry in roots of Douglas-fir seedlings following treatment with methyl jasmonate. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, p. 1075-1083, June 2005.

HUDGINS, J. W.; CHRISTIANSEN, E.; FRANCESCHI, V. R. Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. **Tree Physiology**, Oxford, v. 24, p. 251-264, Jan. 2004.

HUDGINS, J. W.; CHRISTIANSEN, E.; FRANCESCHI, V. R. Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the Pinaceae. **Tree Physiology**, Oxford, v. 23, p. 361-371, Mar. 2003.

KANDEL, S. et al. Characterization of a methyl jasmonate and wounding-responsive cytochrome P450 of *Arabidopsis thaliana* catalyzing dicarboxylic fatty acid formation in vitro. **FEBS Journal**, Oxford, v. 274, n. 19, p. 5116-5127, Oct. 2007.

KOBAYASHI, H.; YANAKA, M.; IKEDA, T. M. Exogenous methyl jasmonate alters trichome density on leaf surfaces of rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth). **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 29, n. 4, p. 506-511, Dec. 2010.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

LAGO, J. H. G. et al. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (*PIPERACEAE*). **Quimica Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1222-1224, set./out. 2007.

LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991.

MARTIN, D. et al. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, n. 3, p. 1003–1018, July 2002.

MEDEIROS, M. F. T.; SENNA-VALLE, L. de; ANDREATA, R. H. P. **Flora medicinal dos sitiantes da reserva particular do patrimônio natural Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil: taxonomia e aspectos etnobotânicos**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2005.

MELO, M. O.; SILVA FILHO, M. C. “Plant-insect interaction: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms”. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 14, p. 7181, 2002.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medical plants of Brazil**. Rio de Janeiro: Laemmert, 2000.

MUZZARELLI, R. A. A. Some modified chitosans and their niche applications. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. **Chitin handbook**. Italy: Atec, 1997. p. 47-52.

NAGORSKAYA, V. P. et al. Effect of chitosan on the cell ultrastructure and activity of hydrolases in tobacco leaves. **Biochemistry**, Washington, v. 54, n. 12, p. 911-915, Dec. 2012.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy Review**, Erandwane, v. 1, n. 1, p. 69-79, Jan./May 2007.

PEETERS, P. J. “Correlations between leaf structural traits and the densities of herbivorous insects guilds”. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 77, p. 43-65, 2002.

PINOT, F. et al. Methyl jasmonate induces lauric acid ω -hydroxylase activity and accumulation of cyp94a1 transcripts but does not affect epoxide hydrolase activities in *inicia sativa* seedlings. **Plant Physiology**, Washington, v. 118 n. 4, p. 1481-1486, Dec. 1998.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 3, p. 1457-1465, 2003.

RANGEL, M. et al. Accumulation of chloroplast-targeted lipoxygenase in passion fruit leaves in response to methyl jasmonate. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 60, n. 6, p. 619–625, July 2002.

REIGADA, J. B. **Bioprospeção em espécies de *Piperaceae***. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

REINA-PINTO, J. J.; YEPHREMOV, A. Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, n. 6, p. 540–549, June 2009.

ROHWER, C. L.; ERWIN, J. E. Horticultural applications of jasmonates: A review. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 83, n. 3, p. 283 - 304, June 2008.

SASAKI, Y. et al. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **DNA Research**, Tokyo, v. 8, p. 153-161, July 2001.

WASTERNAK, C., PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 8, p. 302-307, Aug. 1997.

WEI, J. et al. "Influence of leaf tissue structure on host feeding selection by pea leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae)". **Zoological Studies**, Taipei, v. 39, n. 4, p. 295-300, June 2000.

ZHANG, L.; XING, D. Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent. **Plant and Cell Physiology**, Okayama, v. 49, n. 7, p. 1092-1111, July 2008.

**CAPÍTULO 5 Ação de eliciadores na produção e qualidade do óleo
essencial das folhas e raízes de *Piper mollicomum* Kunth**

1 INTRODUÇÃO

Dentre as *Piperaceae*, *Piper mollicomum*, conhecida popularmente como jaborandi, que embora ainda não seja cultivada comercialmente, possui potencial devido à sua utilidade como medicinal. Possui ação comprovada como antibacteriana (CORDOVA et al., 2010) e antifúngica (LAGO et. al., 2007; REIGADA, 2009) e é bastante utilizada na medicina popular para diversos fins (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; MEDEIROS; SENNA-VALLE; ANDREATA, 2005; BRITO; SENNA-VALLE, 2011).

De suas folhas secas é extraído óleo essencial com elevado rendimento (2,98%) e moderada ação antibacteriana contra *Escherichia coli* (DUARTE et al., 2006). Penedo (2007) identificou o um monoterpeneo (α -Terpineol: 29,51%) e os sesquiterpenos não oxigenados (*Z*-Carofileno: 3,14%, α -Santaleno: 1,58%, α -Guaieno: 2,39%, α -Buneseno: 10,25% e α -Farneseno: 2,74%) e Santos et al. (2001) isolaram oito sesquiterpenos não oxigenados [δ -elemeno: 0,43%, β -elemeno: 0,87%, (*Z*)- β -farneseno: 5,7%, α -cariofileno: 4,23%, germacreno-D: 3,65%, (E,E)- α -farneseno: 2,03%, γ -cadineno: 0,92%, germacreno-B: 1,17%], quatro sesquiterpenos oxigenados [E-nerolidol: 23,20%, oxido de cariofileno: 3,07%, epoxido de humuleno II: 2,29%, (E,E)-farnesol: 10,48%] e uma cetona (2-tridecanona: 4,29%) e um alcool (2-dodecanol), do óleo essencial das folhas.

Das raízes de *P. mollicomum* não foram encontrados na literatura nenhum estudo avaliando o óleo essencial. Somente o trabalho de Jardim (2012), que avaliaram a fase diclorometânica das raízes secas de *P. mollicomum* e isolaram duas amidas isobutílicas [2-Propenamida, 3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-(2E) e 2-Propenamida, 3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-(2Z)] e duas amidas pirrolidínicas [Pirrolidina, 1-[3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2-propenil-(E) e

Pirrolidina, 1-[3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2-propenil-(Z)], além de um fenilpropanoide (2-Metoxi-4,5-metilenodioxipropilfenona).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, cuja produção pode variar com as relações ecológicas e genéticas das plantas e estímulos bióticos e abióticos proporcionados pelo meio ambiente. Elicidores são compostos ou tratamentos, que simulam condições que alterem rotas metabólicas, afetando qualitativamente e/ou quantitativamente a síntese de moléculas bioativas (XU et al., 2008; SIRCAR; MITRA, 2008; MANDAL; MITRA, 2007).

A possibilidade de utilizar eliciadores na indução de metabólitos secundários tem sido crescente nos últimos anos, acarretando em menor custo de produção, que leva ao aquecimento do mercado e domínio dessa tecnologia pelo país, aumentando assim, a competitividade no mercado internacional. Nesse contexto, os compostos quitosana e jasmonato de metila se destacam por alterar o crescimento e o desenvolvimento de diversas espécies vegetais, bem como induzir uma série de metabólitos de interesse comercial.

Quitosana é um biopolímero hidrofílico formado por moléculas de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (RABEA et al., 2003). É o elemento estrutural do exoesqueleto de insetos e crustáceos (Muzzarelli, 1997) e encontrado nas paredes celulares de uma variedade de fungos (BITTELLI et al., 2001). A quitosana é liberada pela ação de enzimas das plantas em paredes celulares microbianas (NAMDEO, 2007) e o mecanismo de ação envolve a sua ligação a receptores presentes na membrana celular (CHEN; XU, 2005).

O jasmonato de metila é o metil éster do fito-hormônio ácido jasmônico e caracteriza-se por conter um anel de ciclopentanona com uma cadeia pentenil inserida no C7, um grupo carbonila no C6 e um acetil metilado no C3 (WASTERNAK; PARTHIER, 1997). É biossintetizado pela via do ácido

linoleico, pela rota octadecanoide durante a fragmentação da membrana plasmática (SASAKI et al., 2001; HOWE; JANDER, 2008). É produzido em resposta aos ferimentos causados por herbívoros e patógenos especialmente os necrotróficos (BROWSE, 2009).

Sendo assim, objetivou-se com este trabalho, avaliar as alterações promovidas por diferentes concentrações dos elicitores de fenilpropanoides, metil jasmonato e quitosana sobre o perfil qualitativo e quantitativo do óleo essencial de folhas e raízes, com o intuito de determinar o tratamento mais produtivo e gerar subsídios técnicos que sejam mais rentáveis ao sistema de produção de *P. mollicomum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Etapa 1 - Obtenção das mudas

As mudas foram obtidas no Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA. Sementes de *P. mollicomum* foram pré-germinadas em placas de petri sobre três folhas de papel de filtro e mantidas em câmara de germinação do tipo *Mangesdorf* a 25 °C durante 30 dias. As plântulas foram transferidas para bandejas de polipropileno expandido de 72 células, contendo substrato organomineral e mantidas em sala de crescimento por 60 dias para o estabelecimento da muda. A sala de crescimento foi programada para apresentar um fotoperíodo de 12 h, radiação incidente de 300 $\mu\text{mol de quanta. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, umidade relativa ao redor de 60% e regime térmico de 25 ± 2 °C.

Após esse período, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de 6 L de substrato (terra de subsolo, areia e esterco bovino, na proporção de 2:1:1) e mantidas em casa de vegetação por 4 meses, sob 50% de sombreamento, utilizando telas pretas, até a submissão dos tratamentos com eliciadores, momento em que as plantas estavam no estágio de florescimento. O ensaio foi conduzido em delineamento blocos casualizados.

Etapa 2 - Elicitação

A quitosana utilizada possui 85% de desacetilação e apresenta fórmula molecular $(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$. As concentrações foram de 2,5; 5 e 10 g L⁻¹, cujas soluções foram preparadas, conforme metodologia descrita por Di Piero e Garda (2008), pela dissolução em ácido clorídrico a 0,05 N com agitação constante e correção do pH para 5,5 com hidróxido de sódio. Como controle foram utilizadas plantas não pulverizadas e plantas pulverizadas apenas com o

solvente. Em cada planta foram pulverizadas 200 mL da solução de quitosana, em toda a parte aérea.

O jasmonato de metila foi utilizado nas concentrações de 0,5; 2,0 e 8 mM, preparada solubilizando-se o produto comercial em *Tween* 20 a 0,1%, conforme Hare (2007). Como controle foram utilizadas plantas não submetidas à aplicação de jasmonato de metila e plantas pulverizadas apenas com o solvente. Em cada planta foram pulverizadas 100 mL das soluções, de maneira a umedecer completamente toda a parte aérea, inclusive ambas as superfícies foliares.

Etapa 3 - Análise fitoquímica do óleo essencial

Preparo do material

O material vegetal foi fracionado em folhas e raízes e submetido à secagem em estufa de ventilação forçada a 30°C, até peso constante. Após foi pulverizado em liquidificador, acondicionado em sacolas plásticas de alta densidade e congelada em *freezer* a -80°C até o momento de extração.

Extração do óleo essencial

No momento da extração aproximadamente 30 g de folha e 17 g de raiz foram pesados e submetidos à hidrodestilação em aparelho de *Clevenger* durante 1,5 h. A separação do hidrolato foi realizada em balão de separação com diclorometano, acondicionado na ausência de luz, desidratado com Na₂SO₄ anidro, evaporado e obtido os rendimentos com base no peso seco do material vegetal. O óleo foi acondicionado em embalagem de vidro vedada e protegida da luz, sendo armazenado em geladeira a 5°C, até o momento da quantificação.

Preparo do óleo

Para a análise do óleo foi realizada uma diluição em diclorometano nas seguintes proporções, para a folha foram utilizados 20 µL de óleo em 600 µL de solvente e para as raízes 5 µL de óleo em 600 µL. O óleo diluído foi acondicionado em vidro âmbar, hermeticamente fechado e armazenado em geladeira a 5°C, até o momento da quantificação.

Análise cromatográfica

O perfil do óleo essencial foi obtido por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa (GC-MS), segundo metodologia descrita por Adams (2007), conforme procedimentos descritos abaixo.

Foi utilizado cromatógrafo a gás (GC6850) acoplado a espectrômetro de massas (MS5975C) – CG-qMS da *Agilent Technologies*, equipado com coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25 µm de fase) tendo hélio como gás de arraste a 1 mL min⁻¹. Foram injetadas 1 µL da solução da amostra, em duplicata. O injetador (*splitless*, 1 mL min⁻¹), e da temperatura da linha de transferência foi realizada a 230 e 260 °C, respectivamente.

Para folha e raiz o gradiente de temperatura empregado foi de 60 a 246 °C (3 °C min⁻¹) e de 246 °C a 300 °C (120 °C min⁻¹).

No entanto, utilizou-se também um segundo método para tentar melhorar a definição dos picos em uma região específica do cromatograma (método 2). Para folhas utilizou-se 110 a 150 °C (1 °C min⁻¹) e de 150 °C a 300 °C (120 °C min⁻¹) e para raiz 120 a 154 °C (1 °C min⁻¹) e de 154 °C a 300 °C (120 °C min⁻¹).

A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos seus índices de retenção aritmético (AI) (ADAMS, 2007), obtido utilizando vários n-alcenos (C9-C22). Os valores de AI foram comparados com a literatura

especificada nas tabelas 1-5. Além disso, os seus espectros de massa foram comparados com os espectros da biblioteca Wiley275.

Etapa 4 - Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o bloco casualizado, com três repetições de duas plantas cada. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e a análise de variância, sendo as médias submetidas ao teste de *Scott-Knot* ($p < 0,05$). Essas análises estatísticas foram efetuadas em programa estatístico *SISVAR* versão 4.3 (FERREIRA, 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação dos constituintes

Pelo método de análise do perfil do óleo essencial baseado no Adams (2007), foi possível identificar para folhas, 43 picos como um só composto e 26 picos como mais de um composto (Tabela 9). Não foi possível identificar 57 picos devido à probabilidade de comparação do espectro de massa com a biblioteca *Wiley275* ser inferior a 85%.

Tabela 9 Análise qualitativa do óleo essencial de folhas de *Piper mollicomum* utilizando o método proposto por Adams (2007).

Legenda: Area Rel. (%) - área relativa em porcentagem no óleo essencial de plantas sem elicitar; RT- média dos tempos de retenção em minutos; Compostos possíveis- nomenclatura segundo a biblioteca Wiley275; Prob.- probabilidade segundo a biblioteca Wiley275; AI calc.- índice de retenção aritmético calculado; AI ref.- índice de retenção aritmético segundo a literatura; Ref.- literatura consultada para obter o AI ref

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,13	4,62	<i>cis</i> -hex-3-enol	87	873	850	Adams (2007)
0,12	6,62	α -pineno	96	934	932	Adams (2007)
0,37	7,94	β -pineno	97	978	974	Adams (2007)
0,05	8,32	Mirceno	96	990	988	Adams (2007)
0,00	9,24	α -terpineno	98	1012	1014	Adams (2007)
		δ -2-Careno	92		1001	Adams (2007)
0,13	9,54	<i>p</i> -cimeno	95	1018	1020	Adams (2007)
		<i>o</i> -cimeno	95		1022	Adams (2007)
		<i>m</i> -cimeno	95		1027	Xu et al (2003)
0,09	9,72	Limoneno	98	1022	1024	Adams (2007)
0,54	10	<i>Trans</i> - β -ocimeno	97	1027	1044	Adams (2007)
		<i>Cis</i> - α -ocimeno	91		1042	Tzakou et al. (1997)
		<i>Cis</i> - β -ocimeno	91		1032	Adams (2007)
1,84	10,42	<i>Trans</i> - β -ocimeno	98	1036	1044	Adams (2007)
		α -ocimeno	95		1042	Tzakou et al. (1997)
		<i>Cis</i> - β -ocimeno			1032	Adams (2007)
		Retrocheno				
0,02	10,87	γ -terpineno	96	1044	1054	Adams (2007)
1,72	11,45	Oxido de <i>cis</i> -linalol	91	1056	1067	Adams (2007)
0,19	12,1	Não identificado		1069		
15,5	12,87	Linalol	93	1084	1095	Adams (2007)
0,35	13,03	6-etenil-2,2,6-trimetil-diidro-2H-Piran-3(4H)-ona	95	1087	1109	Afsharypuor et al. (2003)

Tabela 9, continuação

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,06	13,8	<i>Allo</i> -ocimeno	97	1103	1128	Adams (2007)
		1,2,3,4,5- pentametil ciclopenta-1,3-dieno	91			
		1,3,5,5- tetrametil ciclohexa-1,3-dieno	90			
		2-metil-1-(trimetilciclopropilideno)propeno	87			
0,02	14,05	Não identificado		1111		
0,06	14,29	<i>Cis</i> - β -epoxiocimeno	90	1119	1139	Blagojevic et al. (2006)
		<i>Trans</i> - β -epoxiocimeno	90		1125	Konig et al. (2006)
0,01	14,46	Canfor	95	1123	1141	Adams (2007)
0,01	14,65	Não identificado		1130		
0,04	15,41	Não identificado		1153		
0,03	15,69	Não identificado		1162		
0,04	15,9	4-terpineol	98	1169	1174	Adams (2007)
0,09	16,32	Não identificado		1182		
0,11	16,47	(-)- α -terpineol	91	1186	1186	Adams (2007)
0,04	16,71	Não identificado		1194		
0,06	16,85	Não identificado		1198		
0,2	17,2	Não identificado		1206		
0,03	17,81	Não identificado		1220		
0,03	17,99	Nerol	95	1224	1227	Adams (2007)
0,04	18,32	Não identificado		1231		
0,21	18,52	Não identificado		1235		
0,07	19,29	Piperitona	91	1252	1249	Adams (2007)
0,01	19,51	Não identificado		1227		
0,08	20,09	Não identificado		1269		
0,04	20,32	Não identificado		1274		

Tabela 9, continuação

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,04	20,51	Não identificado		1278		
0,18	20,83	Não identificado		1285		
0,17	21,08	Undecan-2-one	95	1291	1293	Adams (2007)
0,06	21,26	Não identificado		1295		
0,17	21,43	Não identificado		1298		
0,03	22,48	<i>Cis</i> -hex-3-enil tiglato	90	1322	1322	Ruther (2000)
0,19	23,19	6-isopropilideno-1-metilbicyclo[3,1,0]hexano	93	1339		
0,16	23,74	α -cubebeno	99	1351	1345	Adams (2007)
		α -copaeno	87		1374	Adams (2007)
0,13	24,57	Ciclosativeno	99	1370	1369	Adams (2007)
		α -ylangeno	90		1373	Adams (2007)
0,12	24,73	α -ylangeno	99	1374	1373	Adams (2007)
		α -copaeno	97		1374	Adams (2007)
0,66	24,94	α -copaeno	99	1379	1374	Adams (2007)
0,16	25,32	Não identificado		1387		
1,79	25,68	β -elemeno	99	1395	1389	Adams (2007)
0,09	25,85	α -copaeno	91	1399	1374	Adams (2007)
		β -cubebeno	91		1387	Adams (2007)
0,55	26,47	α -gurjuneno	99	1414	1409	Adams (2007)
		1(5),6-guaiadieno	95			
		(-)-aristoleno	93		1429	Nogueira et al. (2001)
		Isolongifoleno	93		1389	Adams (2007)
8,08	27,06	<i>trans</i> -cariofileno	99	1428	1417	Adams (2007)
		Isocariofileno	91		1408	Adams (2007)
		Aromadendreno	87		1439	Adams (2007)
0,66	27,31	β -cubebeno	98	1433	1387	Adams (2007)

Tabela 9, continuação

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,56	27,46	γ -elemeno	98	1437	1434	Adams (2007)
0,34	27,73	(+)-aromadendreno	99	1443	1439	Adams (2007)
		Alloaromadendreno	99		1458	Adams (2007)
		(1S, 6S)- 1,7,7- trimetil-2,3-dimetiliden- <i>trans</i> -biciclo[4.4.0]decano	96			
0,09	27,9	Aromadendreno	95	1447	1439	Adams (2007)
		Alloaromadendreno	95		1458	Adams (2007)
		Seicheleno	91		1444	Adams (2007)
		(+)-calareno	90		1431	Adams (2007)
		γ -gurjuneno	89		1474	Adams (2007)
		Aristoleno	86		1429	Nogueira et al. (2001)
5,68	28,49	<i>Cis,cis,cis</i> -1,1,4,8-tetrametil-4,7,10- cicloundecatrieno	99	1461	1472	Li et al. (2009)
		α -humuleno	98		1452	Adams (2007)
1,26	28,73	Alloaromadendreno	99	1467	1458	Adams (2007)
		β -selineno	96		1489	Adams (2007)
0,2	28,99	Não identificado		1473		
1,1	29,33	δ -selineno	97	1480	1492	Adams (2007)
		α -amorfenos	95		1483	Adams (2007)
		γ -muroleno	95		1478	Adams (2007)
		γ -selineno	86		1480	Xie et al. (2011)
3,93	29,65	Germacreno D	99	1488	1484	Adams (2007)
		Epi-biciclosesquifelandreno	92		1487	Konig et al. (2006)
		2-isopropil-5-metil-9- metilenobiciclo[4.4.0]dec-1-eno	91		1510	Cardeal et al. (2006)
		α -amorfenos	86		1483	Adams (2007)

Tabela 9, continuação

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,85	29,82	β -selineno	99	1492	1489	Adams (2007)
		Valenceno	92		1496	Adams (2007)
0,87	30,02	Tridecan-2-ona	94	1497	1495	Rostad et al. (1986)
3,46	30,26	Bicyclogermacreno	95	1502	1495	Flamini et al. (2007)
		β -guaieno	93		1491	Maia et al. (2000)
		Ledeno	91		1496	Adams (2007)
0,34	30,59	Eremofileno	97	1511	1498	Jantan et al. (2003)
		Valenceno	91		1496	Adams (2007)
1,99	30,96	γ -cadineno	95	1520	1513	Adams (2007)
		2-isopropil-5-metil-9-metilenobicyclo[4,4,0]dec-1-eno	92		1510	Cardeal et al. (2006)
2,6	31,32	δ -cadineno	99	1528	1522	Adams (2007)
		β -cadineno	93		1518	Skaltsa et al. (2003)
0,24	31,64	Cadina-1,4-dieno	98	1536	1532	Telascrea et al. (2007)
0,37	31,85	α -cadineno	97	1541	1537	Adams (2007)
		β -cadineno	89		1518	Skaltsa et al. (2003)
		δ -cadineno	86		1522	Adams (2007)
0,27	32,04	Não identificado		1546		
0,24	32,31	Não identificado		1553		
0,34	32,46	Oxido de cariofileno	94	1556	1582	Adams (2007)
0,65	32,7	Germacreno B	99	1562	1559	Adams (2007)
12,8	33,21	<i>Cis</i> -nerolidol	91	1575	1531	Adams (2007)
1,75	33,74	(-)-Espatuleno	86	1588	1577	Adams (2007)
2,87	33,89	Oxido de cariofileno	96	1591	1582	Adams (2007)
0,67	34,3	Não identificado		1601		
0,22	34,46	Não identificado		1606		

Tabela 9, continuação

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
1,49	34,68	(+)-ledol	99	1611	1602	Adams (2007)
		Globulol	91		1590	Adams (2007)
2,46	34,94	Oxido de humuleno	90	1618	1608	Adams (2007)
0,39	35,06	Não identificado	91	1621		
0,67	35,25	Dilapiol	90	1626	1620	Adams (2007)
0,47	35,36	Não identificado		1629		
0,81	35,57	Não identificado		1634		
0,54	35,74	Não identificado		1639		
0,39	35,9	Não identificado		1643		
2,48	36,12	α -cadinol	86	1648	1652	Adams (2007)
1,45	36,28	δ -cadinol	95	1652	1651	Silva et al. (2007)
0,37	36,47	Eremofileno	92	1657	1498	Jantan et al. (2003)
2,61	36,63	T-murolol	94	1661	1640	Adams (2007)
		T-cadinol	91		1638	Adams (2007)
0,26	36,88	Não identificado		1668		
0,69	37,06	Ciclododeceno	95	1672		
0,84	37,19	Não identificado		1676		
0,49	37,5	Apiol	99	1684	1677	Adams (2007)
0,41	37,77	1-metil[2,2]paraciclofan-1-en	90	1691		
0,28	38,02	Não identificado		1697		
0,21	38,16	Heptadecano	97	1701	1700	Adams (2007)
0,11	38,38	Não identificado		1707		
0,32	38,58	Não identificado		1712		
0,13	38,78	β -costol	97	1718	1766	Adams (2007)
0,29	38,95	Não identificado		1722		
0,25	39,1	Não identificado		1726		

Tabela 9, conclusão

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,08	39,64	Não identificado		1741		
0,17	39,88	Oplopenona	90	1747	1739	Adams (2007)
0,11	40,13	Não identificado		1754		
0,1	40,33	Não identificado		1759		
0,05	40,5	Não identificado		1764		
0,16	40,73	Não identificado		1770		
0,1	41,62	Não identificado		1794		
0,12	41,84	Octadecano	98	1800	1800	Adams (2007)
0,07	42	Não identificado		1805		
0,08	42,18	Não identificado		1810		
0,1	42,28	Não identificado		1813		
0,05	42,68	Não identificado		1824		
0,03	43,02	Não identificado		1834		
0,07	43,26	Não identificado		1840		
0,09	43,41	Não identificado		1845		
0,02	43,89	Não identificado		1858		
0,06	44	Não identificado		1883		
0,15	44,23	Não identificado		1868		
0,11	44,43	Não identificado				
0,06	44,77	Não identificado		1883		
0,07	45,36	Nonadecano	98	1900	1900	Adams (2007)
0,07	45,6	Não identificado		1907		
0,01	48,71	Não identificado				
0,05	49,66	(<i>E,E</i>)-geranilinalol	87	2029	2026	Adams (2007)
0,24	51,32	Octadecan-1-ol	93	2080	2077	Adams (2007)
0,09	52,31	Fitol	91	2112	2103	Zheng et al. (2004)

Através do método proposto por Adams (2007), a probabilidade de identificação foi de 54%.

Os compostos majoritários no óleo essencial das folhas foram o monoterpeneo oxigenado linalol, pico 12,87 minutos (15,5%), o sesquiterpeneo oxigenado *cis*-nerolidol, pico 33,21 minutos (12,8%) e os sesquiterpenos hidrocarbonados *trans*-carofileno ou isocarofileno ou aromadendreno, pico 27,06 minutos (8,08%), *Cis,cis,cis*-1,1,4,8-tetrametil-4,7,10-cicoundecatrieno ou α -humuleno, pico 28,49 minutos (5,68%), % germacreno D ou epibiciclosesquifelandreno ou 2-isopropil-5-metil-9-metilenobiciclo[4.4.0]dec-1-eno ou α -amorfenol, pico 29,65 minutos (3,93%), biciclogermacreno ou β -guaiano ou ledeno, pico 30,26 minutos (3,46%), oxido de carofileno, pico 33,89 minutos (2,87%), T-murolool ou T-cadinol, pico 36,63 minutos (2,61%), δ -cadineno ou β -cadineno, pico 31,32 minutos (2,60%), α -cadinol, pico 36,12 minutos (2,48%), oxido de humuleno, pico 34,94 minutos (2,46%), γ -cadineno ou 2-isopropil-5-metil-9-metilenebiciclo[4,4,0]dec-1-ene, pico 30,96 minutos (1,99%), *trans*- β -ocimeno ou α -ocimeno ou *cis*- β -ocimeno ou retrocheno, pico 10,42 minutos (1,84%), β -elemeno, pico 25,68 minutos (1,79%), (-)-espatulenol, pico 33,74 minutos (1,75%), oxido de *cis*-linalol, pico 11,45 minutos (1,72%), (+)-ledol ou globulol, pico 34,68 minutos (1,49%), δ -cadinol, pico 36,28 minutos (1,45%), aloaromadendreno ou β -selineno, pico 28,73 minutos (1,26%) e δ -selineno ou α -amorfenol ou γ -muroleno ou γ -selineno, pico 29,33 minutos (1,1%). Estes 20 compostos perfizeram 76,86% do óleo essencial. Os outros compostos estão em proporção inferior a 1%.

Segundo Santos et al. (2001), o óleo essencial das folhas frescas de *P. mollicomum* coletadas em um fragmento típico da Mata Atlântica brasileira do Estado do Rio de Janeiro, contém oito sesquiterpenos não oxigenados [δ -elemeno: 0,43%, β -elemeno: 0,87%, (Z)- β -farneseno: 5,7%, α -cariofileno: 4,23%, germacreno-D: 3,65%, (E,E)- α -farneseno: 2,03%, γ -cadineno: 0,92%,

germacreno-B: 1,17%], quatro sesquiterpenos oxigenados [E-nerolidol: 23,20%, oxido de cariofileno: 3,07%, epoxido de humuleno II: 2,29%, (E,E)-farnesol: 10,48%] e uma cetona (2-tridecanona: 4,29%) e um alcool (2-dodecanol).

Por outro lado, Penedo (2007) realizou a quantificação e caracterização do óleo essencial de *P. mollicomum* coletadas no Jardim Botânico do Estado do Rio de Janeiro, obtido por hidrodestilação das folhas frescas, e identificou o um monoterpeneo (α -Terpineol: 29,51%) e os sesquiterpenos não oxigenados (α -Carofileno: 3,14%, α -Santaleno: 1,58%, α -Guaieno: 2,39%, α -Buneseno: 10,25% e α -Farneseno: 2,74%).

Cerca de 60% do óleo essencial da folha é composto por sesquiterpenos e 21% de monoterpeneos (Tabela 10). Os fenólicos e as cetonas perfazem apenas 1% do teor do óleo.

Tabela 10 Classificação dos compostos do óleo essencial de folhas, obtidos pelo método do Adams (2007), nos grupos de metabólitos secundários

Grupo químico	Teor no óleo essencial (%)
Monoterpenos hidrocarbonados	3,09
Monoterpenos oxigenados	17,54
Sesquiterpenos hidrocarbonados	34,68
Sesquiterpenos oxigenados	25,51
Diterpenos oxigenados	0,14
Fenólicos	1,29
Cetonas	1,04
Alcanos	0,4

Pelo método 2 de análise do perfil do óleo essencial, foi possível identificar para folhas, 22 picos como um só composto e 18 picos como mais de um composto (Tabela 11). Não foi possível identificar 28 picos devido à

probabilidade de comparação do espectro de massa com a biblioteca *Wiley275* ser inferior a 85%.

Tabela 11 Análise qualitativa do óleo essencial de folhas de *Piper mollicomum* utilizando o método 2. Legenda: Area Rel. (%)- área relativa em porcentagem no óleo essencial de plantas sem elicitar; RT- média dos tempos de retenção em minutos; Compostos possíveis- nomenclatura segundo a biblioteca Wiley275; Prob.- probabilidade segundo a biblioteca Wiley275; AI calc.- índice de retenção aritmético calculado; AI ref.- índice de retenção aritmético segundo a literatura; Ref.- literatura consultada para obter o AI ref

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,14	6,86	Não identificado		1197		
0,23	7,16	Não identificado		1200		
0,27	8,24	Não identificado		1224		
0,13	10,33	Não identificado		1270		
0,25	10,51	Undecan-2-one	97	1274	1293	Adams (2007)
0,3	10,79	Não identificado		1280		
0,15	12,91	Bicicloelemeno	93	1328	1345	Seo & Baek (2005)
0,13	13,55	α -cubebeno	99	1342	1345	Adams (2007)
0,08	14,62	Cicloisosativeno	96	1366	1369	Adams (2007)
0,1	14,78	α -ylangeno	98	1370	1373	Adams (2007)
		α -cubebeno	92		1345	Adams (2007)
		α -copaeno	90		1374	Adams (2007)
		β -cubebeno	86		1387	Adams (2007)
0,58	15,06	α -copaeno	99	1376	1374	Adams (2007)
0,15	15,53	Não identificado		1387		
2,07	15,95	β -elemeno	99	1396	1389	Adams (2007)
0,52	17,1	α -gurjuneno	99	1414	1409	Adams (2007)
		1(5),6-Guaiadieno	93			
		Isolongifoleno	93		1389	Adams (2007)
8,77	17,92	<i>trans</i> -cariofileno	99	1426	1427,804	Adams (2007)
		<i>cis</i> -cariofileno	99		1408	Adams (2007)
0,62	18,34	β -cubebeno	98	1432	1387	Adams (2007)
0,55	18,6	α -Bergamoteno	94	1435	1430	Lazari et al. (1999)
		α - <i>trans</i> -bergamoteno	93		1432	Adams (2007)

Tabela 11, continuação

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,37	18,98	Aloaromadendreno	99	1441	1458	Adams (2007)
		(+)-aromadendreno	99		1439	Adams (2007)
6,84	20,12	α -humuleno	98	1458	1452	Adams (2007)
1,25	20,51	Aloaromadendreno	99	1463	1458	Adams (2007)
		Aromadendreno	99		1439	Adams (2007)
		α -guaieno	91		1437	Adams (2007)
		γ -himachaleno	91		1481	Adams (2007)
		α -zingibereno	90		1493	Adams (2007)
		β -guaieno	89		1491	Maia et al, (2000)
1,04	21,51	α -amorfenos	97	1478	1483	Adams (2007)
		γ -muroleno	97		1478	Adams (2007)
		Aromadendreno VI	90			
		Epizonareno	90		1500	Maia et al. (2000)
		α -elemeno	90		1505	Radulovic et al. (2006)
3,19	21,94	Germacreno D	98	1484	1487,85	Adams (2007)
0,98	22,28	β -selineno	99	1489	1489	Adams (2007)
		Valenceno	92		1496	Adams (2007)
		Ledeno	90		1496	Adams (2007)
1,55	22,83	Tridecan-2-ona	95	1496	1495	Rostad et al, (1986)
1,88	22,96	α -selineno	95	1499	1498	Adams (2007)
		4,5-dimetil-11-metilenotriciclo[7,2,1,0 (4,9)]dodecano	94			
		Ledeno	91		1496	Adams (2007)

Tabela 11, continuação

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,97	23,28	α -muroleno	97	1502	1500	Adams (2007)
		δ -cadineno	91		1522	Adams (2007)
		β -cadineno	86		1518	Skaltsa et al, (2003)
		Epizonareno	86		1500	Maia et al. (2000)
0,2	23,62	Germacreno A	99	1506	1508	Adams (2007)
		Eremofileno	97		1498	Jantan et al, (2003)
0,17	23,85	β -bisaboleno	98	1509	1505	Adams (2007)
		<i>trans</i> - β -farneseno	83		1454	Adams (2007)
2,4	24,37	γ -cadineno	97	1515	1513	Adams (2007)
		2-isopropil-5-metil-9- metilenobiciclo[4.4.0]dec-1-eno	96		1510	Cardeal et al, (2006)
2,66	25,08	δ -cadineno	98	1524	1522	Adams (2007)
		β -cadineno	94		1518	Skaltsa et al, (2003)
0,13	25,7	Cadina-1,4-dieno	98	1531	1532	Telascrea et al. (2007)
0,08	25,89	Valenceno	95	1534	1496	Adams (2007)
0,31	26,1	α -cadineno	98	1536	1537	Adams (2007)
		β -cadineno	93		1518	Skaltsa et al, (2003)
		δ -cadineno	90		1522	Adams (2007)
0,31	26,47	Não identificado		1540		
0,69	27,23	Não identificado		1549		
0,75	27,64	Germacreno B	99	1554	1559	Adams (2007)
23,91	29,03	<i>cis</i> -nerolidol	95	1572	1531	Adams (2007)
0,39	29,17	Não identificado		1573		
1,88	29,74	(+) Espatuleno	98	1579	1577	Adams (2007)
5,17	30,19	Oxido de cariofileno	95	1584	1582	Adams (2007)
0,15	30,43	Não identificado		1588		

Tabela 11, continuação

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,36	30,67	Viridiflorol	99	1590	1592	Adams (2007)
		δ -gurjuneno	94		1571	Yassa & Akhani (2008)
0,38	30,83	Não identificado		1593		
0,37	31,22	Não identificado		1597		
2,39	31,64	(+)-ledol	99	1602	1602	Adams (2007)
		Globulol	90		1590	Adams (2007)
4,08	32,23	Não identificado		1609		
0,4	32,32	Não identificado		1610		
0,96	32,66	Não identificado		1614		
0,4	33,06	Não identificado		1618		
0,46	33,23	Não identificado		1620		
0,32	33,49	Não identificado		1622		
1,27	33,75	Não identificado		1626		
0,73	34,04	Não identificado		1629		
0,38	34,35	Não identificado		1633		
0,46	34,6	Isoespatulenol	98	1636	1639	Javidnia et al, (2002)
3,62	34,97	Não identificado		1640		
2,24	35,4	δ -cadinol	94	1645	1651	Silva et al, (2007)
0,3	35,6	Não identificado		1647		
3,25	36,13	T-murolol	98	1653	1640	Adams (2007)
		T-cadinol	91		1638	Adams (2007)
0,37	36,32	cariofila-3,8(13)-dien-5 β -ol	90	1655	1654	Schmidt et al, (2006)
1,57	36,81	Não identificado		1660		
0,62	37,26	Não identificado		1665		
0,69	37,59	Não identificado		1669		
0,71	37,73	Ciclododeceno	93	1671		
0,4	38,19	Não identificado		1676		

Tabela 11, conclusão

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,19	38,53	Apiol	98	1679	1677	Adams (2007)
0,48	38,74	3,4'- difluoro-4-metoxibifenil	90	1682		
0,23	39,14	Não identificado		1686		
0,07	39,56	Juniper cânfora	96	1695	1700	Adams (2007)

Através do método 2, a probabilidade de identificação foi de 59%. Os sesquiterpenos hidrocarbonados *cis*-cariofileno, *α-trans*-bergamoteno, *γ*-himachaleno, *α*-zingibereno, aromadendreno VI, germacreno A e *β*-bisaboleno e o sesquiterpeno oxigenado viridiflorol, foram identificados como possíveis de estarem presentes no óleo essencial de *P. mollicomum*, apenas pelo método 2. O sesquiterpeno oxigenado juniper cânfora foi identificado apenas por esse método.

A maior parte dos compostos identificados pertence ao grupo dos sesquiterpenos (Tabela 12). Somente o fenólico oxigenado apiol e as cetonas undecan-2-ona e tridecan-2-ona foram identificados também pelo método 2.

Tabela 12 Classificação dos compostos do óleo essencial obtidos pelo método 2, nos grupos de metabólitos secundários

Grupo químico	Teor no óleo essencial (%)
Monoterpenos hidrogenados	0
Monoterpenos oxigenados	0
Sesquiterpenos hidrogenados	36,79
Sesquiterpenos oxigenados	39,73
Diterpenos oxigenados	0
Fenólicos	0,19
Cetonas	1,8
Alcanos	0

Pelo método de análise do perfil do óleo essencial baseado no Adams (2007), foi possível identificar para raiz, 27 picos como um só composto e 19 picos como mais de um composto (Tabela 13). Não foi possível identificar 3 picos devido à probabilidade de comparação do espectro de massa com a biblioteca *Wiley275* ser inferior a 85%. Naz, Mosaddik e Haque (2009) também encontraram dificuldades de identificação dos compostos do óleo essencial de raiz de *Piper chaba*, uma espécie de *Piperaceae*, utilizando CG/MS.

Tabela 13 Análise qualitativa do óleo essencial de raízes de *Piper mollicomum* utilizando o método proposto por Adams (2007).
 Legenda: Area Rel. (%) - área relativa em porcentagem no óleo essencial de plantas sem elicitar; RT - média dos tempos de retenção em minutos; Compostos possíveis - nomenclatura segundo a biblioteca Wiley275; Prob. - probabilidade segundo a biblioteca Wiley275; AI calc. - índice de retenção aritmético calculado; AI ref. - índice de retenção aritmético segundo a literatura; Ref. - literatura consultada para obter o AI ref

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,05	7,05	Canfeno	95	948	946	Adams (2007)
0,07	9,26	α -terpineno	98	1013	1014	Adams (2007)
		δ -2-Careno	89		1001	Adams (2007)
0,06	9,53	<i>p</i> -cimeno	93	1018	1020	Adams (2007)
		<i>m</i> -cimeni	93		1027	Xu et al (2003)
		<i>o</i> -cimeni	87		1022	Adams (2007)
0,07	9,73	β -felandreno	93	1022	1025	Adams (2007)
0,29	9,81	1,8-cineol	99	1024	1026	Adams (2007)
0,02	10,4	Trans- β -ocimeno	94	1035	1044	Adams (2007)
		α -ocimeno	86		1042	Tzakou et al. (1997)
0,22	10,86	γ -terpineno	97	1044	1054	Adams (2007)
0,07	12,06	δ -Terpineno	98	1068	1086	Adams (2007)
0,46	12,46	Linalol	93	1076	1095	Adams (2007)
0,10	13,42	2-Ciclohexen-1-ol, 1-metil-4-(1-metiletil)-, <i>trans</i>	90	1095	1136	Adams (2007)
		1-terpineol	90		1130	Adams (2007)
0,07	14,19	2-Ciclohexen-1-ol, 1-metil-4-(1-metiletil)-, <i>cis</i>	96	1116	1118	Adams (2007)
		1-terpineol	95		1130	Adams (2007)
0,71	14,42	Cânforo	98	1123	1141	Adams (2007)
0,08	14,62	exo-metil-canfenilol	94	1129	1138	NIMITMAI (2008)

Tabela 13, continuação

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,11	15,37	Borneol	90	1152	1165	Adams (2007)
0,04	15,88	4-terpineol	96	1168	1174	Adams (2007)
		(-)- α -terpineol	87		1186	Adams (2007)
0,18	16,46	(-)- α -terpineol	91	1186	1186	Adams (2007)
0,05	17,21	<i>trans</i> -Piperitol	90	1207	1207	Adams (2007)
		<i>cis</i> -Piperitol	86		1195	Adams (2007)
0,51	19,28	Piperitona	97	1252	1249	Adams (2007)
0,27	20,81	Acetato de bornil	97		1287	Adams (2007)
		Acetato de isobornil	97		1290	Blagojevic´ et al. (2006)
0,02	23,73	α -cubebeno	93	1351	1345	Adams (2007)
		α -copaeno	86		1374	Adams (2007)
0,03	24,91	α -copaeno	99	1378	1374	Adams (2007)
		α -ylangeno	93		1373	Adams (2007)
		β -cubebeno	92		1387	Adams (2007)
0,08	25,6	β -elemeno	90	1394	1389	Adams (2007)
0,43	26,83	<i>trans</i> -cariofileno	99	1422	1417	Adams (2007)
		isocariofileno	86		1408	Adams (2007)
0,33	27,25	Calareno	86	1432	1431	Adams (2007)
0,05	27,49	α -Bergamoteno	90	1438	1430	Lazari et al. (1999)
		α - <i>trans</i> -bergamoteno	87		1432	Adams (2007)
0,05	28,15	Não identificado		1453		
0,36	28,31	<i>Cis,cis,cis</i> -1,1,4,8-tetrametil-4,7,10-cicloundecatrieno	99	1457	1472	Li et al. (2009)
		α -humuleno	98		1452	Adams (2007)
0,10	29,13	Epi-biciclosesquifelandreno	91	1476	1487	Konig et al. (2006)
0,07	29,26	γ -muroleno	98	1479	1478	Adams (2007)
		α -amorfenol	97		1483	Adams (2007)

Tabela 13, continuação

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,41	29,95	Não identificado		1495		
0,51	30,16	pentadecano	97	1500	1500	Adams (2007)
0,31	30,26	α -muuroleno	98	1502	1500	Adams (2007)
		Epizonareno	93		1500	Maia et al. (2000)
		γ -selineno	89		1480	Xie et al. (2011)
		β -cadineno	86		1518	Skaltsa et al. (2003)
17,76	31,23	Miristicina	98	1526	1517	Adams (2007)
1,37	32,42	Elemicina	98	1555	1555	Adams (2007)
		γ -asarone	87		1572	Adams (2007)
0,68	32,78	<i>cis</i> -nerolidol	90	1564	1531	Adams (2007)
0,12	33,06	Pentadecano, 3-metil	96	1571	1570	Zaikin & Borisov (2002)
1,32	34,24	Hexadecano	98	1600	1600	Adams (2007)
21,14	35,44	Dilapiol	97	1629	1620	Adams (2007)
0,51	36,05	α -cadinol	90	1645	1652	Adams (2007)
1,02	36,19	Não identificado		1649		
0,75	37,1	Não identificado		1673		
46,02	37,86	Apiol	98	1693	1677	Adams (2007)
		(3aS,9aS,9bR)-6,6,9aa-trimetil- <i>cis</i> - peridronafto[2,1-b]furan	95			
		2-isopropil-4,5,6-trimetil-3- nitroanilina	90			
		<i>cis</i> -isoapiol	89			
		metil 3-(1-canfenil)propionato	87			
0,93	38,17	Heptadecano	99	1701	1700	Adams (2007)

Tabela 13, conclusão

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,33	38,39	Pentadecano, 2,6,10,14-tetrametil	98	1707		
		Heptadecano, 2,6-dimetil	93			
		Pentadecano, 2,6,10,13-tetrametil	90			
		tetracosano, 2,6,10,15,19,23-hexametil	90			
0,71	41,83	Octadecano	99	1800	1800	Adams (2007)
		Heptadecano, 7-metil	87			
0,39	42,18	Hexadecano, 2,6,10,14-tetrametil	96	1810		
0,41	45,35	Nonadecano	98	1899	1900	Adams (2007)
0,14	47,35	Ácido hexadecanoico	96	1959	1959	Adams (2007)
0,01	48,12	Etil 9-hexadecanoato	98	1982	1954	Numall (2006)
0,06	48,71	Eicosano	96	2000	2000	Adams (2007)

Através do método proposto por Adams (2007), a probabilidade de identificação foi de 94%.

Os compostos majoritários do óleo essencial da raiz são o myristicin, pico 31,23 minutos (17,76%), o dilapiol, pico 35,44 minutos (21,14%), o apiol ou (3aS,9aS,9bR)-6,6,9aa-trimetil-*cis*-peridronafto[2,1-b]furan; 2-isopropil-4,5,6-trimetil-3-nitroanilina ou *cis*-isoapiol ou metil 3-(1-canfenil)propionato), pico 37,86 minutos (46,02%). Esses compostos perfazem 84,92% do teor do óleo essencial.

O óleo essencial da raiz é composto por 86% de compostos fenólicos (Tabela 14). Não foram identificados diterpenos e cetonas no óleo.

Tabela 14 Classificação dos compostos do óleo essencial de raiz obtidos pelo método do Adams (2007), nos grupos de metabólitos secundários

Grupo químico	Teor no óleo essencial (%)
Monoterpenos hidrogenados	0,49
Monoterpenos oxigenados	1,70
Sesquiterpenos hidrogenados	1,78
Sesquiterpenos oxigenados	1,19
Diterpenos oxigenados	0
Fenólicos	86,36
Cetonas	0
Alcanos	3,95

Não existem relatos sobre o óleo essencial de raízes de *P. mollicomum*. No entanto, a partir do estudo fitoquímico da fase diclorometânica das raízes secas de *P. mollicomum*, Jardim (2012), isolou duas amidas isobutílicas [2-Propenamida, 3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-(2E) e 2-Propenamida, 3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)-(2Z)] e duas amidas pirrolidínicas [Pirrolidina, 1-[3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2-propenil-(E) e Pirrolidina, 1-[3-(6-metoxi-1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2-

propenil-(Z)], além de um fenilpropanoide (2-Metoxi-4,5-metilenodioxipropilfenona).

Alguns compostos identificados no óleo das raízes de *P. mollicomum* também foram observados por Naz, Mosaddik e Haque (2009) em raízes de *Piper chaba*, como β -elemeno, α -humuleno, α -amorfenol e ácido hexadecanoico.

É interessante notar a forte presença do composto dilapiol nas raízes, que pela primeira vez é relatado para essa espécie, mas que está presente na parte aérea do *Piper aduncum*, perfazendo 73,97 a 82,2% do teor do óleo essencial (FAZOLIN et al., 2005a; FAZOLIN et al., 2005b; ESTRELA et al., 2006). Esse composto apresenta elevado interesse comercial devido às suas propriedades como inseticida sinérgico ao dolapiol (FAZOLIN et al., 2005a; FAZOLIN et al., 2005b; ESTRELA et al., 2006; SCOTT et al., 2008) e inibidor específico de aflatoxina (RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2007).

Pelo método 2 de análise do perfil do óleo essencial, foi possível identificar para raízes, 7 picos como um só composto e 13 picos como mais de um composto (Tabela 15). Não foi possível identificar 2 picos devido à probabilidade de comparação do espectro de massa com a biblioteca Wiley275 ser inferior a 85%.

Tabela 15 Análise qualitativa do óleo essencial de raízes de *Piper mollicomum*. utilizando o método 2. Legenda: Area Rel. (%)- área relativa em porcentagem no óleo essencial de plantas sem elicitar; RT- média dos tempos de retenção em minutos; Compostos possíveis- nomenclatura segundo a biblioteca Wiley275; Prob.- probabilidade segundo a biblioteca Wiley275; AI calc.- índice de retenção aritmético calculado; AI ref.- índice de retenção aritmético segundo a literatura; Ref.- literatura consultada para obter o AI ref

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
0,47	7,20	Piperitona	97	1248	1249	Adams (2007)
0,25	8,15	Acetato de isobornil	90	1277	1290	Blagojevic´ et al. (2006)
		(-)-Acetato de bornil	87		1287	Adams (2007)
0,09	12,15	Não identificado		1400		
0,05	13,47	α -santalena	96	1424	1416	Adams (2007)
		α -trans-bergamotena	91		1432	Adams (2007)
0,34	13,61	trans-cariofileno	99	1427	1417	Adams (2007)
		Aromadendreno	87		1439	Adams (2007)
0,38	14,04	β -cubebeno	98		1387	Adams (2007)
		Germacreno-D	90		1484	Adams (2007)
0,11	15,12	trans-beta-Farneseno	86	1454	1454	Adams (2007)
0,3	15,34	Cis,cis,cis-1,1,4,8-tetrametil-4,7,10-cicoundecatrieno	99	1459	1472	Li et al. (2009)
		α -humuleno	98		1452	Adams (2007)
0,11	17,32	(E,Z)- α -Farneseno	94	1495	1475	Ziegenbein et al. (2006)
		α -Farneseno, (E,E)	90		1505	Adams (2007)
0,71	17,58	Pentadecano	98	1500	1500	Adams (2007)
0,39	17,88	α -muroleno	96	1504	1500	Adams (2007)
		Cascariladieno	86			
		β -cadineno	86		1518	Skaltsa et al. (2003)
		Epinozareno	86		1500	Maia et al. (2000)
17,9	19,20	Miristicina	98	1523	1517	Adams (2007)
0,38	19,41	δ -cadineno	99	1526	1522	Adams (2007)
		β -cadineno	98		1518	Skaltsa et al. (2003)

Tabela 15, conclusão

Area Rel. (%)	RT	Compostos possíveis	Prob.	AI calc.	AI ref.	Ref.
1,13	21,19	Elemicina	98	1552	1555	Adams (2007)
		γ -asarona	91		1572	Adams (2007)
		2,6-dimetil-exo-triciclo[5.2.1.0 ^{2,6}]decane-3-endo-carboxilico acido	90			
0,62	21,83	<i>cis</i> -nerolidol	91	1561	1531	Adams (2007)
0,93	24,53	Hexadecano	98	1600	1600	Adams (2007)
21,83	26,61	Dilapiol	97	1626	1620	Adams (2007)
		<i>cis</i> -isoapiol	90			
		metil 3-(1-canfenil)propionato	90			
0,35	27,72	α -cadinol	93	1639	1652	Adams (2007)
0,67	28,04	Não identificado		1643		
51,94	31,62	Apiol	98	1688	1677	Adams (2007)
		(3aS,9aS,9bR)-6,6,9aa-trimetil- <i>cis</i> -perfidronafto[2,1-b]furan	95			
		2-isopropil-4,5,6-trimetil-3-nitroanilina	90			
		<i>cis</i> -isoapiol	89			
		metil 3-(1-canfenil)propionato	86			
0,91	32,70	Heptadecano	99	1703	1700	Adams (2007)
		Iron, tricarbonil[N-(fenil-2-piridinilm	90			
		Hexatriacontano	90			

Através do método 2, a probabilidade de identificação foi de 91%. Somente dois compostos foram identificados apenas no método 2 (*trans-β*-farnesene e δ -cadinene ou β -cadinene, respectivamente, picos 15,12 e 19,41). Outros compostos observados por Naz, Mosaddik e Haque (2009) em raízes de *Piper chaba*, só foram identificados no óleo das raízes de *P. mollicomum* pelo método 2, como *trans*-caryophyllene, germacrene-D, aromadendrene, α -muurolene e δ -cadinene.

Foram identificados 93% de compostos fenólicos através do método 2 (Tabela 16). Não foram identificados monoterpenos hidrogenados, diterpenos e cetonas por esse método.

Tabela 16 Classificação dos compostos do óleo essencial de raiz obtidos pelo método 2, nos grupos de metabólitos secundários

Grupo químico	Teor no óleo essencial (%)
Monoterpenos hidrogenados	0
Monoterpenos oxigenados	0,47
Sesquiterpenos hidrogenados	2,06
Sesquiterpenos oxigenados	0,97
Diterpenos oxigenados	0
Fenólicos	92,8
Cetonas	0
Alcanos	2,55

3.2 Influência da quitosana

Foi observado redução no teor de óleo essencial de folhas de *Piper mollicomum* após aplicação de 10 g L⁻¹ quitosana, sendo que as demais concentrações não diferiram entre si (Gráfico 11). Nas raízes o maior teor foi obtido após aplicação de 2,5 g L⁻¹ de quitosana e o menor nas plantas sem elicitar e após aplicação de 10 g L⁻¹ quitosana.

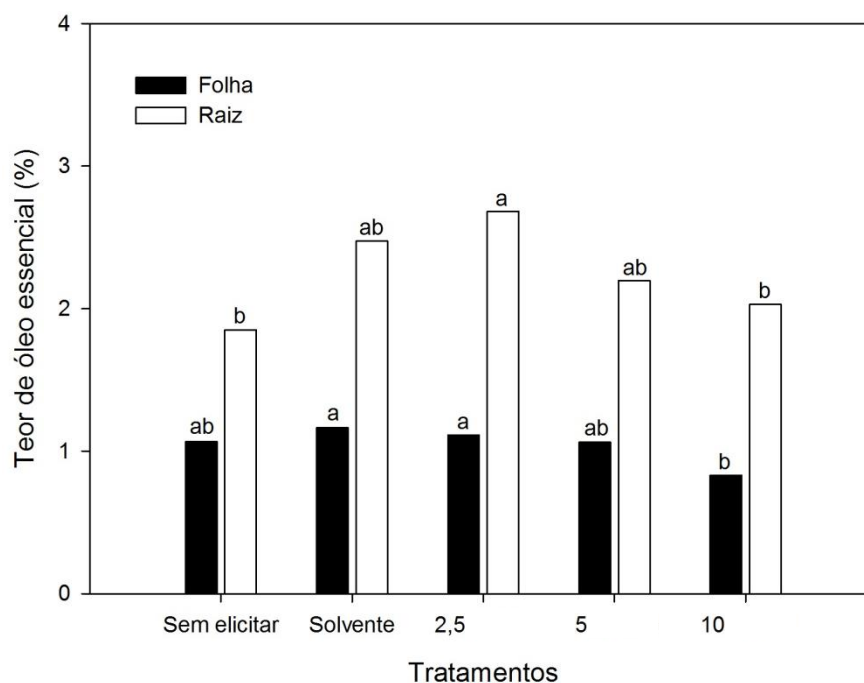


Gráfico 11 Teor de óleo essencial de folhas de *Piper mollicomum* após tratamento com quitosana a 2,5, 5 e 10 g L⁻¹, controle sem elicitar e somente com o solvente (ácido clorídrico a 0,05N). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p<0,05), considerando cada órgão isoladamente.

O teor do óleo essencial de folhas foi baixo (cerca de 1%), quando comparado com Duarte et al. (2006), cujo teor foi 2,98%. Não existem relatos sobre o teor do óleo essencial de raízes de *P. mollicomum*.

A redução no teor de óleo essencial de folhas após aplicação de 10 g L⁻¹ de quitosana pode ter sido causada pelo aumento da peroxidação lipídica (Cap2) e instalação da morte celular programada (Cap4) observadas nesse ensaio. Ou mesmo devido à redução na taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração observada para essa concentração (Cap3), que poderiam acarretar em menor energia e esqueletos de carbono disponíveis para a produção de metabólitos secundários.

Também pode estar relacionada com a redução dos tricomas glandulares (Cap4), uma vez que a produção de óleos essenciais nas plantas está geralmente associada à presença de estruturas secretoras especializadas, tais como tricomas glandulares (FAHN, 1979).

Por outro lado, nas raízes, o aumento do teor do óleo essencial na menor concentração de quitosana pode estar relacionado com o aumento na eficiência de carboxilação, observada nesse tratamento (cap3), o que poderia acarretar em maior energia e esqueletos de carbono disponíveis para a produção de metabólitos secundários. Com isso pode-se supor que o aumento no teor de óleo essencial das raízes após aplicação de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de quitosana, pode oferecer proteção potencial contra patógenos do solo.

A composição do óleo se manteve praticamente constante após aplicação de quitosana (Tabela 17). Somente o pico correspondente ao tempo de retenção 9,24 minutos, identificado como monoterpene hidrocarbonado α -terpinene ou δ -2-carene, foi observado apenas nas plantas pulverizadas com a quitosana.

Tabela 17 Área relativa em porcentagem no óleo essencial obtido pelo método proposto por Adams (2007), extraído de folhas de *Piper mollicomum* após tratamento com quitosana a 2,5, 5 e 10 g L⁻¹, controle sem elicitar e somente com o solvente (ácido clorídrico a 0,05N). Legenda: RT- média dos tempos de retenção em minutos; Compostos possíveis- nomenclatura segundo a biblioteca Wiley275

Compostos possíveis	RT	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
<i>cis</i> -hex-3-enol	4,62	0,13 a	0,08 b	0,05 b	0,13 a	0,12 a
<i>α</i> -pineno	6,62	0,12	0,07	0,04	0,13	0,08
<i>β</i> -pineno	7,94	0,37	0,28	0,2	0,39	0,32
Mirceno	8,32	0,05	0,04	0,03	0,05	0,04
<i>α</i> -terpineno	9,24	0,00 b	0,00 b	0,02 a	0,03 a	0,02 a
<i>δ</i> -2-Careno						
<i>p</i> -cimeno	9,54	0,13 c	0,17 c	0,33 a	0,25 b	0,16 c
<i>o</i> -cimeno						
<i>m</i> -cimeno						
Limoneno	9,72	0,09	0,09	0,07	0,1	0,08
<i>Trans-β</i> -ocimeno	10	0,54	0,39	0,33	0,39	0,46
<i>Cis-α</i> -ocimeno						
<i>Cis-β</i> -ocimeno						
<i>Trans-β</i> -ocimeno	10,42	1,84	1,32	1,1	1,26	1,47
<i>α</i> -ocimeno						
<i>Cis-β</i> -ocimeno						
Rotrocheno						
<i>γ</i> -terpineno	10,87	0,02	0,02	0,07	0,05	0,02
Oxido de <i>cis</i> -linalol	11,45	1,72 b	1,64 b	1,17 b	2,13 a	2,27 a
Não identificado	12,1	0,19	0,2	0,18	0,33	0,25
Linalol	12,87	15,50 b	14,74 b	12,10 c	18,72 a	17,82 a
6-etenil-2,2,6-trimetil-diidro-2H-Piran-3(4H)-ona	13,03	0,35 a	0,31 a	0,22 b	0,42 a	0,39 a

Tabela 17, continuação

Compostos possíveis	RT	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
<i>Allo-ocimeno</i>	13,8	0,06	0,05	0,04	0,05	0,05
1,2,3,4,5- pentametil ciclopenta- 1,3-dieno						
1,3,5,5- tetrametil ciclohexa-1,3- dieno						
2-metil-1-(trimetilciclopropilideno) propeno						
Não identificado	14,05	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03
<i>Cis-β</i> -epoxiocimeno	14,29	0,06 a	0,06 a	0,04 b	0,07 a	0,07 a
<i>Trans-β</i> -epoxiocimeno						
Canfor	14,46	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
Não identificado	14,65	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Não identificado	15,41	0,04 a	0,04 a	0,03 b	0,05 a	0,05 a
Não identificado	15,69	0,03 b	0,04 b	0,03 b	0,05 a	0,05 a
4-terpineol	15,9	0,04 b	0,04 b	0,05 a	0,05 a	0,05 a
Não identificado	16,32	0,09	0,1	0,06	0,21	0,11
(-)- α -terpineol	16,47	0,11 c	0,12 c	0,10 c	0,13 b	0,15 a
Não identificado	16,71	0,04	0,04	0,03	0,06	0,05
Não identificado	16,85	0,06 a	0,04 a	0,03 b	0,05 a	0,05 a
Não identificado	17,2	0,2	0,15	0,1	0,14	0,17
Não identificado	17,81	0,03	0,03	0,03	0,07	0,03
Nerol	17,99	0,03	0,03	0,02	0,03	0,04
Não identificado	18,32	0,04 b	0,04 b	0,03 c	0,05 a	0,05 a
Não identificado	18,52	0,21 c	0,19 d	0,19 d	0,23 b	0,25 a
Piperitona	19,29	0,07 c	0,07 c	0,05 c	0,08 b	0,09 a
Não identificado	19,51	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02

Tabela 17, continuação

Compostos possíveis	RT	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
Não identificado	20,09	0,08	0,09	0,05	0,14	0,1
Não identificado	20,32	0,04 b	0,05 a	0,04 b	0,05 a	0,05 a
Não identificado	20,51	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Não identificado	20,83	0,18 a	0,17 b	0,13 c	0,20 a	0,22 a
Undecan-2-one	21,08	0,17 b	0,17 b	0,14 c	0,19 a	0,19 a
Não identificado	21,26	0,06	0,07	0,03	0,11	0,08
Não identificado	21,43	0,17 c	0,17 c	0,17 c	0,18 b	0,20 a
<i>Cis</i> -hex-3-enil tiglato	22,48	0,03	0,03	0,02	0,04	0,03
6-isopropilideno-1-metilbiciclo[3,1,0]hexano	23,19	0,19 a	0,18 a	0,20 a	0,14 b	0,13 b
α -cubebeno	23,74	0,16	0,13	0,11	0,14	0,1
α -copaeno						
Ciclosativeno	24,57	0,13 a	0,14 a	0,14 a	0,11 b	0,08 b
α -ylangeno						
α -ylangeno	24,73	0,12 a	0,11 a	0,10 a	0,08 b	0,07 b
α -copaeno						
α -copaeno	24,94	0,66 a	0,66 a	0,62 a	0,49 b	0,41 b
Não identificado	25,32	0,16 a	0,16 a	0,17 a	0,12 b	0,12 b
β -elemeno	25,68	1,79 a	1,82 a	1,92 a	1,28 b	1,37 b
α -copaeno	25,85	0,09 a	0,06 b	0,05 b	0,05 b	0,05 b
β -cubebeno						
α -gurjuneno	26,47	0,55 a	0,59 a	0,58 a	0,33 b	0,34 b
1(5),6-guaiadieno						
(-)-aristoleno						
Isolongifoleno						
<i>trans</i> -cariofileno	27,06	8,08	7,4	6,76	5,93	6,21

Tabela 17, continuação

Compostos possíveis	RT	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
Isocariofileno						
Aromadendreno						
β-cubebeno	27,31	0,66 a	0,67 a	0,69 a	0,47 b	0,44 b
γ-elemeno	27,46	0,56 a	0,56 a	0,58 a	0,39 b	0,38 b
(+)-aromadendreno	27,73	0,34 a	0,30 b	0,27 c	0,25 c	0,21 d
Alloaromadendreno						
(1S, 6S)- 1,7,7- trimetil-2,3-						
dimetiliden-<i>trans</i>-						
biciclo[4.4.0]decano						
Aromadendreno	27,9	0,09 a	0,09 a	0,09 a	0,07 b	0,06 b
Alloaromadendreno						
Seicheleno						
(+)-calareno						
γ-gurjuneno						
Aristoleno						
<i>Cis,cis,cis</i>-1,1,4,8-tetrametil-4,7,10-						
cicoundecatrieno	28,49	5,68	5,29	4,94	4,58	4,81
α-humuleno						
Alloaromadendreno	28,73	1,26 a	1,29 a	1,31 a	0,92 b	0,88 b
β-selineno						
Não identificado	28,99	0,2	0,18	0,19	0,17	0,19
δ-selineno	29,33	1,1	1,05	1,12	1,03	0,83
α-amorfenos						
γ-muroleno						
γ-selineno						

Tabela 17, continuação

Compostos possíveis	RT	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
Germacreno D	29,65	3,93	3,51	3,69	2,17	2,61
Epi-biciclosesquifelandreno						
2-isopropil-5-metil-9-metilenobiciclo[4.4.0]dec-1-eno						
<i>α</i> -amorfeno						
<i>β</i> -selineno	29,82	0,85 a	0,84 a	0,86 a	0,73 b	0,64 b
Valenceno						
Tridecan-2-ona	30,02	0,87	0,87	0,9	0,85	0,84
Bicyclogermacreno	30,26	3,46 a	3,35 a	3,72 a	2,06 b	2,52 b
<i>β</i> -guaieno						
Ledeno						
Eremofileno	30,59	0,34 a	0,29 b	0,33 a	0,25 b	0,25 b
Valenceno						
<i>γ</i> -cadineno	30,96	1,99 a	1,98 a	2,07 a	1,71 b	1,69 b
2-isopropil-5-metil-9-metilenobiciclo[4,4,0]dec-1-eno						
<i>δ</i> -cadineno	31,32	2,60 a	2,58 a	2,67 a	1,69 b	1,91 b
<i>β</i> -cadineno						
Cadina-1,4-dieno	31,64	0,24 a	0,19 b	0,24 a	0,18 b	0,20 b
<i>α</i> -cadineno	31,85	0,37 a	0,36 a	0,39 a	0,31 b	0,28 b
<i>β</i> -cadineno						
<i>δ</i> -cadineno						
Não identificado	32,04	0,27	0,24	0,27	0,24	0,22
Não identificado	32,31	0,24 a	0,16 b	0,18 b	0,27 a	0,29 a
Oxido de cariofileno	32,46	0,34	0,3	0,28	0,36	0,32
Germacreno B	32,7	0,65 a	0,63 a	0,69 a	0,47 b	0,54 b

Tabela 17, continuação

Compostos possíveis	RT	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
<i>Cis</i> -nerolidol	33,21	12,80 d	17,39 b	21,52 a	14,27 c	15,05 c
(-)-Espatulenol	33,74	1,75	2,36	1,52	2,17	2,01
Oxido de cariofileno	33,89	2,87	2,67	3,14	3,92	3,21
Não identificado	34,3	0,67 b	0,56 b	0,56 b	0,79 a	0,80 a
Não identificado	34,46	0,22	0,24	0,24	0,28	0,25
(+)-ledol	34,68	1,49 b	1,47 b	1,44 b	1,63 a	1,72 a
Globulol						
Oxido de humuleno	34,94	2,46 b	2,31 b	1,99 b	3,18 a	2,97 a
Não identificado	35,06	0,39 b	0,39 b	0,40 b	0,43 a	0,46 a
Dilapiol	35,25	0,67 b	0,60 b	0,65 b	0,60 b	0,80 a
Não identificado	35,36	0,47 b	0,44 b	0,47 b	0,49 b	0,55 a
Não identificado	35,57	0,81 c	0,81 c	0,82 c	0,91 b	0,98 a
Não identificado	35,74	0,54 b	0,49 b	0,49 b	0,65 a	0,66 a
Não identificado	35,9	0,39	0,39	0,39	0,45	0,46
α -cadinol	36,12	2,48 c	2,46 c	2,29 d	2,66 b	2,95 a
δ -cadinol	36,28	1,45 c	1,26 d	1,18 d	1,58 b	1,79 a
Eremofileno	36,47	0,37 b	0,36 b	0,33 b	0,48 a	0,45 a
T-murolol	36,63	2,61 b	2,50 b	2,51 b	2,78 a	2,93 a
T-cadinol						
Não identificado	36,88	0,26 b	0,23 b	0,23 b	0,30 a	0,33 a
Ciclododeceno	37,06	0,69	0,6	0,57	0,62	0,65
Não identificado	37,19	0,84	0,86	0,87	1,06	1,02
Apiol	37,5	0,49	0,45	0,54	0,51	0,55
1-metil[2,2]paraciclofan-1-en	37,77	0,41 b	0,36 b	0,36 b	0,50 a	0,46 a
Não identificado	38,02	0,28	0,28	0,34	0,26	0,24
Heptadecano	38,16	0,21 b	0,13 b	0,16 b	0,31 a	0,33 a

Tabela 17, continuação

Compostos possíveis	RT	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
Não identificado	38,38	0,11	0,08	0,1	0,17	0,15
Não identificado	38,58	0,32	0,28	0,28	0,38	0,39
<i>β-costol</i>	38,78	0,13	0,11	0,12	0,16	0,15
Não identificado	38,95	0,29	0,25	0,25	0,35	0,35
Não identificado	39,1	0,25	0,24	0,22	0,35	0,3
Não identificado	39,64	0,08	0,08	0,08	0,16	0,09
Oplopenona	39,88	0,17 b	0,17 b	0,18 b	0,26 a	0,20 a
Não identificado	40,13	0,11	0,1	0,1	0,16	0,12
Não identificado	40,33	0,1	0,1	0,11	0,18	0,12
Não identificado	40,5	0,05	0,03	0,05	0,07	0,06
Não identificado	40,73	0,16	0,16	0,17	0,27	0,19
Não identificado	41,62	0,1	0,09	0,08	0,16	0,11
Octadecano	41,84	0,12	0,05	0,07	0,2	0,17
Não identificado	42	0,07	0,06	0,07	0,1	0,07
Não identificado	42,18	0,08 a	0,04 b	0,05 b	0,12 a	0,11 a
Não identificado	42,28	0,1	0,12	0,11	0,14	0,09
Não identificado	42,68	0,05	0,06	0,05	0,11	0,06
Não identificado	43,02	0,03	0,02	0,03	0,07	0,04
Não identificado	43,26	0,07	0,06	0,06	0,13	0,06
Não identificado	43,41	0,09	0,07	0,1	0,13	0,07
Não identificado	43,89	0,02	0,02	0,01	0,05	0,02
Não identificado	44	0,06	0,05	0,04	0,09	0,05
Não identificado	44,23	0,15	0,14	0,13	0,11	0,12
Não identificado	44,43	0,11	0,1	0,09	0,11	0,08
Não identificado	44,77	0,06	0,06	0,04	0,09	0,05
Nonadecano	45,36	0,07 b	0,04 b	0,04 b	0,11 a	0,09 a

Tabela 17, conclusão

Compostos possíveis	RT	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
Não identificado	45,6	0,07	0,08	0,06	0,09	0,05
Não identificado	48,71	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02
(E,E)-geranillinalol	49,66	0,05	0,06	0,07	0,04	0,05
Octadecan-1-ol	51,32	0,24 c	0,36 b	0,54 a	0,17 c	0,18 c
Fitol	52,31	0,09 b	0,11 b	0,17 a	0,04 c	0,05 c

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha, não diferem entre si, pelo teste de *Scott Knott* a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)

O *cis*-hexen-3-ol reduziu no solvente e na menor concentração de quitosana, no entanto manteve-se semelhante às plantas sem elicitar, nas demais concentrações de quitosana. Os compostos não identificados correspondentes aos tempos de retenção 20,83, 32,31 e 42,18 minutos, também apresentaram o mesmo comportamento. Embora o *cis*-hexen-3-ol seja produzido pelas plantas como resultado da degradação oxidativa dos lipídios da membrana plasmática (REDDY; GUERRERO, 2004) e normalmente emitidos por plantas danificadas por herbívoros ou por outros agentes (D'AURIA et al., 2007), não aumentou com o eliciador quitosana.

As maiores concentrações de quitosana (5 e 10 g L⁻¹) promoveram maiores modificações na quantidade dos constituintes do óleo essencial, aumentando ou reduzindo significativamente, dependendo do composto.

Os compostos que aumentaram após aplicação de 5 e 10 g L⁻¹ de quitosana foram: os monoterpenos oxigenados *cis*-linalool oxide (pico 11,45), linalool (pico 12,87), (-)- α -terpineol (pico 16,47) e piperitone (pico 19,29); os sesquiterpenos oxigenados (+)-ledol ou globulol (pico 34,68), humulene oxide (pico 34,94), T-muurolol ou T-cadinol (pico 36,63), oplophenone (pico 39,88), α -cardinol (pico 36,12) e δ -cardinol (pico 36,28); o sesquiterpeno hidrocarbonado eremophilene (pico 36,47); a cetona undecan-2-one (pico 21,08); os alcanos nonadecane (pico 45,36), heptadecane (pico 38,16); o composto 1-methyl[2,2]paracyclophan-1-em (pico 37,77); e os compostos não identificados correspondentes aos picos 15,69; 18,32; 18,52; 20,32; 21,43; 34,3; 35,06; 35,57; 35,74 e 36,88.

Os compostos que reduziram após aplicação de 5 e 10 g L⁻¹ de quitosana foram: os sesquiterpenos hidrocarbonados cycosativene ou α -ylangene (pico 24,57), α -ylangene ou α -copaene (pico 24,73), α -copaene (pico 24,94), β -elemene (25,68), α -gurjunene ou 1(5),6-guaiadiene ou (-)-aristolene ou isolongifolene (26,47), β -cubebene (27,31), γ -elemene (27,46), aromadendrene

ou alloaromadendrene ou seychellen ou (+)-calarene ou γ -gurjunene ou aristolene (pico 27,9), alloaromadendrene ou β -selinene (pico 28,73), β -selinene ou valencene (29,82), bicyclogermacrene ou β -guaiene ou ledene (pico 30,26), γ -cadinene ou 2-isopropyl-5-methyl-9-methylenebicyclo[4,4,0]dec-1-ene (30,96), δ -cadinene ou β -cadinene (31,32), α -cadinene ou β -cadinene ou δ -cadinene (31,85), germacrene B (32,7), eremophilene ou valencene (30,59), cadina-1,4-diene (31,64); o diterpeno phytol (52,31), o composto 6-isopropylidene-1-methylbicyclo[3,1,0]hexane (pico 23,19) e os compostos não identificados correspondentes aos picos 25,32 e 32,31.

É interessante notar que de maneira geral, os compostos oxigenados aumentaram, enquanto os hidrocarbonados diminuíram após aplicação das maiores concentrações de quitosana. Esse resultado pode estar relacionado com o aumento do acúmulo de peróxido de hidrogênio, observada principalmente após aplicação de 10 g L^{-1} de quitosana (cap2).

Em algumas espécies o H_2O_2 induzido por eliciador promove o acúmulo de metabólitos secundários de plantas (ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005). Segundo Lei et al. (2011), o acúmulo de H_2O_2 e O_2^- induzido por quitosana, provavelmente acelerou a conversão de ácido diidroartemisínico a artemisinina. Esses autores relatam que o resultado obtido está de acordo com a hipótese de que o ácido diidroartemisínico pode remover ROS produzindo o sesquiterpeno lactonizado artemisinina como produto final estável.

Os compostos que apresentaram o maior aumento na maior concentração foram: os monoterpenos oxigenados (-)- α -terpineol (pico 16,47) e piperitone (pico 19,29); o fenólico oxigenado dillapiol (pico 35,25); os sesquiterpenos oxigenados α -cardinol (pico 36,12) e δ -cardinol (pico 36,28); e os compostos não identificados correspondentes aos picos 18,52, 21,43, 35,36 e 35,57. É relevante mencionar que o dilapiol é um composto que apresenta elevado interesse comercial devido as suas propriedades como um inseticida

sinérgico ao dolapiol (FAZOLIN et al., 2005a; FAZOLIN et al., 2005b; ESTRELA et al., 2006; SCOTT et al., 2008) e inibidor específico de aflatoxina (RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2007). No presente ensaio, esse composto aumentou 19% após aplicação de 10 g L⁻¹ de quitosana.

Os monoterpenos oxigenado 4-terpineol (pico 15,9) e hidrocarbonado α -terpinene ou δ -2-Carene (pico 9,24) aumentaram em todas as concentrações de quitosana.

Os sesquiterpenos hidrocarbonado α -copaene ou β -cubebene (pico 25,85) e o oxigenado cis-nerolidol (pico 33,21), reduziram em todas as concentrações de quitosana, inclusive no solvente. Por outro lado, o pico 27,73, identificado como compostos possíveis os sesquiterpenos hidrocarbonados (+)-aromadendrene, allooromadendrene e (1S, 6S)- 1,7,7- trimethyl-2,3-dimethyliden-trans-bicyclo[4.4.0]decane, reduziu gradativamente no solvente e com o aumento das concentrações de quitosana.

Os sesquiterpenos hidrocarbonados eremophilene ou valencene (pico 30,59) e cadina-1,4-diene (pico 31,64), apresentaram a maior redução no solvente.

O sesquiterpeno oxigenado δ -cardinol (36,28) e o composto não identificado (18,52) reduziram apenas no solvente e na menor concentração de quitosana. Enquanto o álcool octadecan-1-ol (51,32) aumentou nesses tratamentos.

A alteração na quantidade de alguns compostos promovida pelo solvente está de acordo com a proposta de que por si só ele é um agente estressante. Esse resultado está de acordo com as alterações no metabolismo antioxidante e fenólico (cap2), bem como nas trocas gasosas (cap3) e estrutura foliar (cap4) observadas após aplicação do solvente.

A menor concentração de quitosana proporcionou a maior área relativa dos seguintes compostos: o fenólico hidrocarbonado *p*-cymene ou *o*-cimene ou

m-cimene (9,54); o álcool octadecan-1-ol (51,32); o sesquiterpeno oxigenado *cis*-nerolidol (33,21); e o diterpeno oxigenado phytol (52,31). No entanto, reduziu o composto 6-ethenyl-2,2,6-trimethyl-dihydro-2H-Pyran-3(4H)-one (13,03); os monoterpenos oxigenados Linalool (12,87) e *cis*- β -epoxyocimene ou *trans*- β -epoxyocimene (14,29); a cetona undecan-2-one (21,08); o sesquiterpeno oxigenado α -cardinol (36,12); e os compostos não identificados correspondentes aos picos 15,41, 16,85 e 18,32.

Modificações nos constituintes do óleo essencial induzidas pela quitosana foram observadas em outros trabalhos, como aumento nos compostos fenólicos eugenol, metil eugenol (KIM et al., 2005) e safrol (VALLE, 2003). Quitosana também aumenta os compostos terpênicos, como os monoterpenos mentol, mentona e pulegona (CHANG; SHIN; CHUNG, 1998), linalol (KIM et al., 2005; LOCKWOOD et al., 2007), limoneno (LOCKWOOD et al., 2007) e geraniol (KAHLOS; KIVIRANTA; HILTUNEN, 1994); diterpenos (CROTEAU et al., 1987); triterpenoides (FAN et al., 2010) e o sesquiterpeno lactonizado artemisinina (PUTALUN et al., 2007; LEI et al., 2011).

A composição do óleo das raízes não foi alterada em termos qualitativos, porém, diferiu quantitativamente (Tabela 18). A maior parte dos compostos aumentou em função da aplicação de quitosana, mas alguns reduziram. A maior concentração de quitosana promoveu modificações quantitativas em um maior número de compostos em relação aos demais tratamentos, principalmente aumentando-os.

Tabela 18 Área relativa em porcentagem no óleo essencial obtido pelo método proposto por Adams (2007), extraído de raízes de *Piper mollicomum* após tratamento com quitosana a 2,5, 5 e 10 g L⁻¹, controle sem elicitar e somente com o solvente (ácido clorídrico a 0,05N). Legenda: RT- média dos tempos de retenção em minutos; Compostos possíveis- nomenclatura segundo a biblioteca Wiley275

RT	Compostos possíveis	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
7,05	Canfeno	0,05 b	0,13 a	0,16 a	0,09 b	0,13 a
9,26	α -terpineno	0,07 c	0,13 b	0,14 b	0,12 b	0,19 a
9,53	δ -2-Careno	0,06 d	0,09 c	0,11 b	0,07 d	0,13 a
	<i>p</i> -cimeno					
	<i>m</i> -cimene					
9,73	β -felandreno	0,07 b	0,13 a	0,12 a	0,10 a	0,14 a
	1,8-cineol	0,29 c	0,34 c	0,45 b	0,33 c	0,52 a
10,4	Trans- β -ocimeno	0,02 c	0,05 a	0,05 a	0,02 c	0,03 b
10,86	α -ocimeno	0,22 c	0,36 b	0,38 b	0,34 b	0,54 a
12,06	γ -terpineno					
12,46	δ -Terpineno	0,07 c	0,11 b	0,12 b	0,10 b	0,17 a
13,42	Linalol	0,46 d	0,50 d	0,70 b	0,56 c	1,00 a
	2-Ciclohexen-1-ol, 1-metil-4-(1-metiletil)-, <i>trans</i> 1-terpineol	0,10 c	0,09 c	0,11 b	0,08 c	0,14 a
14,19	2-Ciclohexen-1-ol, 1-metil-4-(1-metiletil)-, <i>cis</i> 1-terpineol	0,07 b	0,06 c	0,08 b	0,06 c	0,09 a
14,42	Cânforo	0,71 c	0,72 c	0,91 b	0,68 c	1,13 a
14,62	exo-metil-canfenilol	0,08 b	0,07 b	0,09 a	0,06 b	0,09 a
15,37	Borneol	0,11 c	0,10 c	0,16 a	0,08 d	0,14 b

Tabela 18, continuação

RT	Compostos possíveis	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
15,88	4-terpineol	0,04 c	0,04 c	0,06 b	0,04 c	0,08 a
	(-)- α -terpineol					
16,46	(-)- α -terpineol	0,18 d	0,20 c	0,25 b	0,17 d	0,28 a
17,21	<i>trans</i> -Piperitol	0,05 b	0,04 c	0,05 b	0,04 c	0,07 a
	<i>cis</i> -Piperitol					
19,28	Piperitona	0,51 b	0,46 b	0,51 b	0,50 b	0,96 a
20,81	Acetato de bornil	0,27 d	0,39 b	0,51 a	0,25 d	0,30 c
	Acetato de isobornil					
23,73	α -cubebeno	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
	α -copaeno					
24,91	α -copaeno	0,03	0,11	0,05	0,03	0,03
	α -ylangeno					
	β -cubebeno					
25,6	β -elemeno	0,08 b	0,09 a	0,10 a	0,10 a	0,08 b
26,83	<i>trans</i> -cariofileno	0,43 c	0,40 c	0,39 c	0,50 b	0,61 a
	isocariofileno					
27,25	Calareno	0,33 c	0,42 b	0,52 a	0,30 c	0,35 c
27,49	α -Bergamoteno	0,05 b	0,05 b	0,05 b	0,06 b	0,09 a
	α - <i>trans</i> -bergamoteno					
28,15	Não identificado	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05
28,31	<i>Cis,cis,cis</i> -1,1,4,8-tetrametil-4,7,10-cicoundecatrieno	0,36 b	0,28 c	0,30 c	0,35 b	0,46 a
	α -humuleno					
29,13	Epi-biciclosesquifelandreno	0,10	0,09	0,10	0,08	0,10

Tabela 18, continuação

RT	Compostos possíveis	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
29,26	<i>γ</i> -muroleno	0,07 c	0,08 b	0,09 a	0,06 d	0,08 b
	<i>α</i> -amorfenol					
29,95	Não identificado	0,41	0,39	0,41	0,42	0,46
30,16	pentadecano	0,51 b	0,49 b	0,49 b	0,64 a	0,58 a
30,26	<i>α</i> -muuroloeno	0,31 c	0,37 b	0,44 a	0,30 c	0,40 b
	Epizonareno					
	<i>γ</i> -selineno					
	<i>β</i> -cadineno					
31,23	Miristicina	17,76 a	14,13 c	13,40 d	16,85 b	17,56 a
32,42	Elemicina	1,37	1,3	1,32	1,47	1,36
	<i>γ</i> -asarone					
32,78	<i>cis</i> -nerolidol	0,68 b	0,62 b	0,72 b	0,66 b	1,00 a
33,06	Pentadecano, 3-metil	0,12	0,09	0,08	0,11	0,12
34,24	Hexadecano	1,32	1,09	1,02	1,2	1,39
35,44	Dilapiol	21,14 c	19,34 d	17,04 e	23,58 a	22,01 b
36,05	<i>α</i> -cadinol	0,51 b	0,42 c	0,36 c	0,51 b	0,66 a
36,19	Não identificado	1,02 b	0,85 c	0,79 c	0,98 b	1,26 a
37,1	Não identificado	0,75 b	0,77 b	0,81 b	0,60 c	1,03 a
37,86	Apiol	46,02 c	51,93 b	54,24 a	44,66 c	41,40 d
	(3aS,9aS,9bR)-6,6,9aa-trimetil- <i>cis</i> - peridronafto[2,1-b]furan					
	2-isopropil-4,5,6-trimetil-3- nitroanilina					
	<i>cis</i> -isoapiol					
	metil 3-(1-canfenil)propionato					

Tabela 18, conclusão

RT	Compostos possíveis	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	2,5	5	10
38,17	Heptadecano	0,93	0,74	0,66	0,88	0,86
38,39	Pentadecano, 2,6,10,14-tetrametil	0,33	0,3	0,26	0,39	0,29
	Heptadecano, 2,6-dimetil					
	Pentadecano, 2,6,10,13-tetrametil					
	tetracosano, 2,6,10,15,19,23-hexametil					
41,83	Octadecano	0,71	0,53	0,46	0,61	0,63
	Heptadecano, 7-metil					
42,18	Hexadecano, 2,6,10,14-tetrametil	0,39	0,3	0,24	0,33	0,35
45,35	Nonadecano	0,41	0,31	0,25	0,33	0,35
47,35	Ácido hexadecanoico	0,14	0,08	0,03	0,06	0,06
48,12	Etil 9-hexadecanoato	0,01 c	0,12 a	0,11 a	0,04 b	0,02 c
48,71	Eicosano	0,06 a	0,03 b	0,03 b	0,03 b	0,03 b

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha, não diferem entre si, pelo teste de *Scott Knott* a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)

Os compostos que aumentaram após aplicação de 10 g L⁻¹ de quitosana foram: os monoterpenos hidrocarbonados camphene (pico 7,05), α -terpinene ou δ -2-Carene (pico 9,26), 1,8-cineole (pico 9,81), *p*-cymene ou *m*-cimene ou *o*-cimene (pico 9,53), γ -terpinene (pico 10,86) e δ -terpinene (pico 12,06); os monoterpeno oxigenados linalool (pico 12,46), 2-cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, *trans* ou 1-terpineol (pico 13,42 e 14,19), camphor (pico 14,42), 4-terpineol ou (-)- α -terpineol (pico 15,88), (-)- α -terpineol (pico 16,46), *trans*-piperitol ou *cis*-piperitol (pico 17,21) e piperitone (pico 19,28); os sesquiterpenos hidrocarbonados *trans*-caryophyllene ou isocaryophyllen (pico 26,83), α -Bergamotene ou α -*trans*-bergamotene (pico 27,49) e *Cis,cis,cis*-1,1,4,8-tetramethyl-4,7,10-cycloundecatriene ou α -humulene (pico 28,31); sesquiterpenos oxigenados *cis*-nerolidol (pico 32,78 e α -cadinol (pico 36,05); o álcool *exo*-methyl-camphenilol (pico 14,62) e os compostos não identificados correspondentes aos picos 36,19 e 37,1 minutos.

Apenas o pico 37,86 minutos, indentificado como o fenólico oxigenado apiole ou (3aS,9aS,9bR)-6,6,9aa-trimethyl-*cis*-perhydronaphtho[2,1-b]furan ou 2-isopropyl-4,5,6-trimethyl-3-nitroaniline ou *cis*-isoapiole ou methyl 3-(1-camphenyl)propionate, apresentou menor área relativa após aplicação de 10 g L⁻¹ de quitosana.

Os compostos que aumentaram após aplicação de 5 e 10 g L⁻¹ de quitosana foram: o sesquiterpeno hidrocarbonado *trans*-caryophyllene ou isocaryophyllen (pico 26,83); o alcano pentadecane (pico 30,16) e o fenólico oxigenado dillapiole (pico 35,44). Desses, o dillapiole foi maior na concentração de 5 g L⁻¹ de quitosana.

A menor concentração de quitosana também alterou quantitativamente uma série de compostos do óleo. Os compostos que aumentaram foram o fenólico oxigenado apiole ou (3aS,9aS,9bR)-6,6,9aa-trimethyl-*cis*-perhydronaphtho[2,1-b]furan ou 2-isopropyl-4,5,6-trimethyl-3-nitroaniline ou

cis-isoapiole ou methyl 3-(1-camphenyl)propionate (pico 37,86); o álcool exo-methyl-camphenilol (pico 14,62); monoterpene oxigenado borneol (pico 15,37); éster bornyl acetate ou isobornyl acetate (pico 20,81); os sesquiterpenos hidrocarbonados calarene (pico 27,25), γ -muurolene ou α -amorphene (pico 29,26) e α -muurolene ou epizonaren ou γ -selinene ou β -cadinene (pico 30,26). Os compostos que reduziram foram os fenólicos oxigenados dillapiole (pico 35,44) e myristicin (pico 31,23).

Alguns compostos alteraram a área relativa após aplicação da menor concentração de quitosana e do solvente. Os compostos que aumentaram foram: os monoterpene hidrocarbonados camphene (pico 7,05) e *trans*- β -ocimene ou α -ocimene (pico 10,4); fenólico hidrocarbonado *p*-cymene ou *m*-cimene ou *o*-cimene (pico 9,53); e o composto ethyl 9-hexadecanoate (pico 48,12). Os compostos que diminuíram foram: o sesquiterpene hidrocarbonado *cis,cis,cis*-1,1,4,8-tetramethyl-4,7,10-cycloundecatriene ou α -humulene (pico 28,31); o sesquiterpene oxigenado α -cadinol (pico 36,05); e o composto não identificado correspondente ao pico 36,19 minutos.

O solvente e após a aplicação de 2,5 e 5 g L⁻¹ de quitosana promoveram aumento no fenólico oxigenado myristicin (pico 31,23), enquanto reduziram o sesquiterpene hidrocarbonado (pico 25,6) β -elemene.

Os compostos que aumentaram no solvente e em todas as concentrações de quitosana foram os monoterpene hidrocarbonados β -phellandrene (pico 9,73), α -terpinene ou δ -2-Carene (pico 9,26), γ -terpinene (pico 10,86) e δ -Terpinene (pico 12,06). No entanto, o alcane eicosane (pico 48,71) reduziu.

Por outro lado, o monoterpene oxigenado linalool (pico 12,46) aumentou após aplicação de todas as concentrações de quitosana, sendo que na maior concentração o aumento foi de 117%.

Não foram encontrados na literatura ensaios que avaliaram o metabolismo dos óleos essenciais de raízes após aplicação de quitosana.

3.3 Influência do jasmonato de metila

Com relação ao jasmonato de metila, não foi observada diferenças estatísticas para o teor de óleo essencial extraído de folhas (Gráfico 12). Nas raízes o maior teor foi obtido após aplicação de 2 mM de jasmonato de metila e o menor, nas plantas sem elicitar.

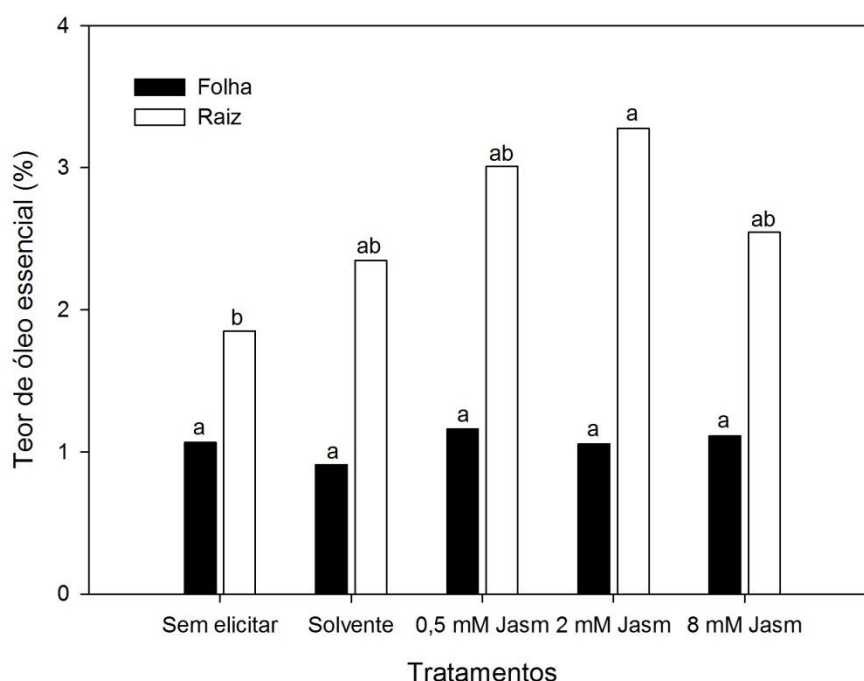


Gráfico 12 Teor de óleo essencial de folhas de *Piper mollicomum* após tratamento com jasmonato de metila a 0,5 mM, 2 mM e 8 mM, controle sem elicitar e somente com o solvente (*Tween* 20 a 0,1%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), considerando cada órgão isoladamente

A composição do óleo das folhas não foi alterada em termos qualitativos, apenas diferiu quantitativamente após aplicação de jasmonato de metila (Tabela 19). A maior parte dos compostos reduziu em função da aplicação de jasmonato de metila, mas alguns aumentaram.

Tabela 19 Área relativa em porcentagem no óleo essencial obtido pelo método proposto por Adams (2007), extraído de folhas de *Piper mollicomum* após tratamento com jasmonato de metila a 0,5 mM, 2 mM e 8 mM, controle sem elicitar e somente com o solvente (*Tween* 20 a 0,1%). Legenda: RT- média dos tempos de retenção em minutos; Compostos possíveis-nomenclatura segundo a biblioteca *Wiley275*

RT	Compostos possíveis	Tratamento				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
4,62	<i>cis</i> -hex-3-enol	0,13 a	0,06 c	0,1 b	0,09 b	0,13 a
6,62	α -pineno	0,12 a	0,01 b	0,12 a	0,11 a	0,12 a
7,94	β -pineno	0,37 a	0,08 b	0,32 a	0,32 a	0,34 a
8,32	Mirceno	0,05 a	0,02 b	0,04 a	0,04 a	0,04 a
9,24	α -terpineno					
	δ -2-Careno					
9,54	<i>p</i> -cimeno	0,13	0,09	0,07	0,03	0,03
	<i>o</i> -cimeno					
	<i>m</i> -cimeno					
9,72	Limoneno	0,09 a	0,04 b	0,08 a	0,08 a	0,08 a
10	<i>Trans</i> - β -ocimeno	0,54	0,19	0,52	0,43	0,34
	<i>Cis</i> - α -ocimeno					
	<i>Cis</i> - β -ocimeno					
10,42	<i>Trans</i> - β -ocimeno	1,84	0,6	1,86	1,52	1,24
	α -ocimeno					
	<i>Cis</i> - β -ocimeno					
	Retrocheno					
10,87	γ -terpineno	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01
11,45	Oxido de <i>cis</i> -linalol	1,72	1,45	1,78	1,6	1,84
12,1	Não identificado	0,19	0,18	0,18	0,17	0,3
12,87	Linalol	15,5	13,19	14,13	12,52	11,74
13,03	6-etenil-2,2,6-trimetil-diidro-2H-Piran-3(4H)-ona	0,35	0,27	0,34	0,35	0,36

Tabela 19, continuação

RT	Compostos possíveis	Tratamento				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
13,8	<i>Allo</i> -ocimeno 1,2,3,4,5- pentametil ciclopenta-1,3- dieno 1,3,5,5- tetrametil ciclohexa-1,3-dieno 2-metil-1- (trimetilciclopropilideno)propeno	0,06	0,03	0,05	0,05	0,04
14,05	Não identificado	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
14,29	<i>Cis</i> - β -epoxiocimeno <i>Trans</i> - β -epoxiocimeno	0,06 a	0,04 b	0,04 b	0,04 b	0,04 b
14,46	Canfor	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02
14,65	Não identificado	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
15,41	Não identificado	0,04	0,03	0,03	0,03	0,05
15,69	Não identificado	0,03	0,05	0,06	0,04	0,06
15,9	4-terpineol	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04
16,32	Não identificado	0,09	0,12	0,07	0,08	0,19
16,47	(-)- α -terpineol	0,11	0,11	0,1	0,11	0,1
16,71	Não identificado	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
16,85	Não identificado	0,06 a	0,02 b	0,03 b	0,03 b	0,02 b
17,2	Não identificado	0,20 a	0,07 b	0,12 b	0,10 b	0,06 b
17,81	Não identificado	0,03	0,03	0,02	0,02	0,07
17,99	Nerol	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03
18,32	Não identificado	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04
18,52	Não identificado	0,21 b	0,25 a	0,18 b	0,2 b	0,21 b
19,29	Piperitona	0,07	0,06	0,05	0,04	0,05
19,51	Não identificado	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02
20,09	Não identificado	0,08	0,06	0,05	0,04	0,08

Tabela 19, continuação

RT	Compostos possíveis	Tratamento				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
20,32	Não identificado	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05 a
20,51	Não identificado	0,04	0,05	0,04	0,05	0,04
20,83	Não identificado	0,18	0,17	0,17	0,18	0,2
21,08	Undecan-2-one	0,17 a	0,15 b	0,15 b	0,16 a	0,15 b
21,26	Não identificado	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04
21,43	Não identificado	0,17	0,2	0,17	0,2	0,18
22,48	<i>Cis</i> -hex-3-enil tiglato	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04
23,19	6-isopropilideno-1-metilbicyclo[3,1,0]hexano	0,19	0,18	0,25	0,28	0,22
23,74	α -cubebeno	0,16	0,12	0,13	0,15	0,14
24,57	α -copaeno					
	Ciclosativeno	0,13	0,12	0,11	0,12	0,12
	α -ylangeno					
24,73	α -ylangeno	0,12	0,09	0,11	0,12	0,09
	α -copaeno					
24,94	α -copaeno	0,66	0,56	0,59	0,71	0,56
25,32	Não identificado	0,16	0,16	0,15	0,18	0,13
25,68	β -elemeno	1,79	1,79	1,81	2,05	1,45
25,85	α -copaeno	0,09	0,05	0,06	0,07	0,05
	β -cubebeno					
26,47	α -gurjuneno	0,55	0,47	0,53	0,61	0,42
	1(5),6-guaiadieno					
	(-)-aristoleno					
	Isolongifoleno					

Tabela 19, continuação

RT	Compostos possíveis	Tratamento				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
27,06	<i>trans</i> -cariofileno	8,08	7,29	7,65	8,33	6,29
	Isocariofileno					
	Aromadendreno					
27,31	β -cubebeno	0,66	0,61	0,56	0,66	0,6
27,46	γ -elemeno	0,56	0,47	0,52	0,57	0,39
27,73	(+)-aromadendreno	0,34	0,27	0,31	0,34	0,31
	Alloaromadendreno					
	(1S, 6S)- 1,7,7- trimetil-2,3- dimetiliden- <i>trans</i> -biciclo[4.4.0]decano					
27,9	Aromadendreno	0,09	0,08	0,1	0,11	0,09
	Alloaromadendreno					
	Seicheleno					
	(+)-calareno					
	γ -gurjuneno					
	Aristoleno					
28,49	<i>Cis,cis,cis</i> -1,1,4,8-tetrametil-4,7,10- cicloundecatrieno	5,68	5,45	5,46	5,93	4,82
	α -humuleno					
28,73	Alloaromadendreno	1,26	1,13	1,27	1,39	1,17
	β -selineno					
28,99	Não identificado	0,2	0,22	0,21	0,22	0,22
29,33	δ -selineno	1,1	1,01	1,13	1,23	1,18
	α -amorfenno					
	γ -muroleno					
	γ -selineno					

Tabela 19, continuação

RT	Compostos possíveis	Tratamento				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
29,65	Germacreno D	3,93	3,33	4,4	5,09	3,39
	Epi-biciclosesquifelandreno					
	2-isopropil-5-metil-9-metilenobiciclo[4.4.0]dec-1-eno					
	α -amorfenol					
29,82	β -selineno	0,85	0,84	0,83	0,88	0,84
	Valenceno					
30,02	Tridecan-2-ona	0,87	0,87	0,86	0,96	0,97
30,26	Bicyclogermacreno	3,46	3,41	4,03	4,28	3,12
	β -guaïeno					
	Ledeno					
30,59	Eremofileno	0,34	0,32	0,45	0,45	0,41
	Valenceno					
30,96	γ -cadineno	1,99 b	2,13 a	1,92 b	2,14 a	2,00 b
	2-isopropil-5-metil-9-metilenobiciclo[4,4,0]dec-1-eno					
31,32	δ -cadineno	2,6	2,43	2,7	2,95	2,24
	β -cadineno					
31,64	Cadina-1,4-dieno	0,24	0,24	0,32	0,32	0,32
31,85	α -cadineno	0,37	0,38	0,39	0,4	0,41
	β -cadineno					
	δ -cadineno					
32,04	Não identificado	0,27	0,29	0,29	0,28	0,35
32,31	Não identificado	0,24	0,31	0,37	0,31	0,34
32,46	Oxido de cariofileno	0,34	0,39	0,27	0,3	0,5
32,7	Germacreno B	0,65	0,7	0,78	0,78	0,62

Tabela 19, continuação

RT	Compostos possíveis	Tratamento				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
33,21	<i>Cis</i> -nerolidol	12,8 b	16,19 a	13,00 b	12,59 b	16,08 a
33,74	(-)-Espatulenol	1,75 b	2,22 a	1,34 b	1,48 b	1,63 b
33,89	Oxido de cariofileno	2,87	2,97	2,6	2,7	3,83
34,3	Não identificado	0,67	0,86	0,99	0,79	1,13
34,46	Não identificado	0,22	0,27	0,2	0,19	0,26
34,68	(+)-ledol	1,49	1,56	1,63	1,61	1,65
	Globulol					
34,94	Oxido de humuleno	2,46	2,7	2,28	2,4	2,83
35,06	Não identificado	0,39	0,42	0,44	0,42	0,43
35,25	Dilapiol	0,67	0,8	0,72	0,75	0,65
35,36	Não identificado	0,47	0,47	0,51	0,51	0,5
35,57	Não identificado	0,81	0,86	0,85	0,84	0,9
35,74	Não identificado	0,54	0,6	0,56	0,58	0,68
35,9	Não identificado	0,39	0,44	0,42	0,38	0,44
36,12	α -cadinol	2,48	2,6	2,57	2,63	2,58
36,28	δ -cadinol	1,45	1,61	1,5	1,51	1,66
36,47	Eremofileno	0,37	0,4	0,37	0,57	0,43
36,63	T-murolol	2,61	2,75	2,56	2,26	2,82
	T-cadinol					
36,88	Não identificado	0,26	0,31	0,27	0,26	0,3
37,06	Ciclododeceno	0,69	0,67	0,72	0,74	0,71
37,19	Não identificado	0,84	1,00	0,76	0,74	0,97
37,5	Apiol	0,49	0,58	0,51	0,49	0,51
37,77	1-metil[2,2]paraciclofan-1-en	0,41	0,46	0,44	0,40	0,51
38,02	Não identificado	0,28	0,33	0,28	0,31	0,31
38,16	Heptadecano	0,21	0,44	0,55	0,32	0,61

Tabela 19, continuação

RT	Compostos possíveis	Tratamento				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
38,38	Não identificado	0,11	0,22	0,23	0,15	0,32
38,58	Não identificado	0,32	0,38	0,34	0,31	0,36
38,78	<i>β</i> -costol	0,13	0,16	0,16	0,12	0,18
38,95	Não identificado	0,29	0,32	0,29	0,28	0,36
39,1	Não identificado	0,25	0,32	0,26	0,23	0,3
39,64	Não identificado	0,08	0,1	0,06	0,04	0,14
39,88	Oplopenona	0,17	0,25	0,24	0,14	0,3
40,13	Não identificado	0,11	0,15	0,13	0,08	0,18
40,33	Não identificado	0,1	0,16	0,14	0,1	0,2
40,5	Não identificado	0,05	0,09	0,1	0,04	0,14
40,73	Não identificado	0,16	0,26	0,18	0,13	0,27
41,62	Não identificado	0,1	0,14	0,1	0,06	0,14
41,84	Octadecano	0,12	0,28	0,34	0,19	0,44
42	Não identificado	0,07	0,09	0,07	0,05	0,1
42,18	Não identificado	0,08	0,16	0,18	0,11	0,21
42,28	Não identificado	0,1	0,13	0,1	0,05	0,14
42,68	Não identificado	0,05	0,09	0,06	0,03	0,09
43,02	Não identificado	0,03	0,06	0,04	0,02	0,05
43,26	Não identificado	0,07	0,13	0,09	0,06	0,15
43,41	Não identificado	0,09	0,14	0,1	0,08	0,15
43,89	Não identificado	0,02	0,04	0,03	0,02	0,05
44	Não identificado	0,06	0,08	0,06	0,04	0,09
44,23	Não identificado	0,15	0,16	0,13	0,16	0,11
44,43	Não identificado	0,11	0,14	0,11	0,11	0,12
44,77	Não identificado	0,06	0,07	0,03	0,03	0,04
45,36	Nonadecano	0,07	0,16	0,19	0,12	0,27

Tabela 19, conclusão

RT	Compostos possíveis	Tratamento				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
45,6	Não identificado	0,07	0,11	0,06	0,05	0,07
48,71	Não identificado	0,01	0,02	0,03	0,02	0,04
49,66	(<i>E,E</i>)-geranilinalol	0,05	0,06	0,05	0,07	0,06
51,32	Octadecan-1-ol	0,24 b	0,29 b	0,22 b	0,39 a	0,25 b
52,31	Fitol	0,09 b	0,11 b	0,1 b	0,17 a	0,09 b

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha, não diferem entre si, pelo teste de *Scott Knott* a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)

O solvente promoveu alteração em um grande número de compostos, reduzindo a maioria e aumentando alguns. Os compostos que aumentaram foram: o sesquiterpeno oxigenado (-)-spathulenol (pico 33,74) e um composto não identificado correspondente ao pico 18,52 minutos. Os que reduziram foram: o álcool volátil cis-hex-3-enol (pico 4,62); os monoterpenos hidrocarbonados α -pinene (pico 6,62), β -pinene (pico 7,94), mircene (pico 8,32) e limonene (pico 9,72).

É interessante notar que o solvente *Tween 20* (Monolaurato de polioxietileno 20 sorbitano - polissorbato 20) a 0,1%, também foi eficiente em promover a indução do sistema antioxidante e dos fenólicos (cap2). No cultivo de células, o *Tween 20* é utilizado para aumentar a permeabilização da membrana e promover a liberação dos metabólitos secundários acumulados intracelularmente em vacúolos (CAI et al., 2012).

O solvente também promoveu aumento na taxa fotossintética (cap3), o que poderiam acarretar em maior energia e esqueletos de carbono disponíveis para a produção de metabólitos secundários. Esse aumento é importante para a biossíntese de metabólitos secundários que teriam a função de proteção contra a herbivoria pela redução da palatabilidade.

Após aplicação de 2 mM de jasmonato de metila os compostos que apresentaram maior área relativa foram o álcool octadecan-1-ol (pico 51,32) e o diterpeno oxigenado phytol (pico 52,31), com aumento de respectivamente 62,5% e 89%.

O pico 30,96, identificado como compostos possíveis os sesquiterpenos hidrocarbonados γ -cadinene ou 2-isopropyl-5-methyl-9-methylenebicyclo [4,4,0]dec-1-ene, aumentou após aplicação do solvente e de jasmonato de metila a 2 mM. Já o sesquiterpeno oxigenado *cis*-nerolidol (pico 33,21) aumentou no solvente e na maior concentração de jasmonato de metila aplicada.

O *cis*-hex-3-enol (pico 4,62) reduziu após aplicação do solvente e de jasmonato de metila a 0,5 e 2 mM, enquanto a cetona undecan-2-one (pico 21,08) reduziu após aplicação do solvente e de jasmonato de metila a 0,5 e 8 mM.

O monoterpene oxigenado *cis*- β -epoxyocimene ou *trans*- β -epoxyocimene (pico 14,29) e os compostos compostos não identificados, correspondentes aos picos 16,85 e 17,2 minutos, reduziram no solvente e em todas as concentrações de jasmonato de metila.

A raiz foi mais influenciada pelos tratamentos que a folha, sendo que o solvente promoveu aumento em um maior número de compostos (Tabela 20).

Tabela 20 Área relativa em porcentagem no óleo essencial obtido pelo método proposto por Adams (2007), extraído de raízes de *Piper mollicomum* após tratamento com jasmonato de metila a 0,5 mM, 2 mM e 8 mM, controle sem elicitar e somente com o solvente (*Tween* 20 a 0,1%). Legenda: RT- média dos tempos de retenção em minutos; Compostos possíveis-nomenclatura segundo a biblioteca *Wiley275*

RT	Compostos possíveis	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
7,05	Canfeno	0,05 b	0,13 a	0,07 b	0,11 a	0,12 a
9,26	α -terpineno	0,07 c	0,16 a	0,07 c	0,11 b	0,12 b
9,53	δ -2-Careno	0,06 c	0,13 a	0,07 c	0,10 b	0,10 b
	<i>p</i> -cimeno					
	<i>m</i> -cimeni					
	<i>o</i> -cimeni					
9,73	β -felandreno	0,07	0,14	0,13	0,13	0,16
9,81	1,8-cineol	0,29	0,49	0,34	0,36	0,39
10,4	Trans- β -ocimeno	0,02 b	0,04 a	0,02 b	0,02 b	0,03 a
	α -ocimeno					
10,86	γ -terpineno	0,22 c	0,49 a	0,22 c	0,35 b	0,38 b
12,06	δ -Terpineno	0,07 c	0,15 a	0,07 c	0,11 b	0,12 b
12,46	Linalol	0,46 c	0,87 a	0,37 c	0,51 c	0,68 b
13,42	2-Ciclohexen-1-ol, 1-metil-4-(1-metiletil)-, <i>trans</i> 1-terpineol	0,10 b	0,13 a	0,08 b	0,09 b	0,10 b
14,19	2-Ciclohexen-1-ol, 1-metil-4-(1-metiletil)-, <i>cis</i> 1-terpineol	0,07 b	0,09 a	0,06 b	0,06 b	0,07 b
14,42	Cânforo	0,71 c	1,19 a	0,69 c	0,74 c	0,9 b
14,62	exo-metil-canfenilol	0,08 b	0,11 a	0,07 b	0,07 b	0,08 b
15,37	Borneol	0,11 b	0,17 a	0,08 c	0,08 c	0,10 b
15,88	4-terpineol	0,04 b	0,07 a	0,04 b	0,04 b	0,05 b
	(-)- α -terpineol					

Tabela 20, continuação

RT	Compostos possíveis	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
16,46	(-)- α -terpineol	0,18 b	0,27 a	0,18 b	0,18 b	0,22 b
17,21	<i>trans</i> -Piperitol	0,05 b	0,06 a	0,03 b	0,03 b	0,04 b
	<i>cis</i> -Piperitol					
19,28	Piperitona	0,51 b	0,93 a	0,48 b	0,55 b	0,58 b
20,81	Acetato de bornil	0,27 d	0,36 b	0,3 c	0,26 d	0,41 a
	Acetato de isobornil					
23,73	α -cubebeno	0,02 a	0,03 a	0,02 a	0,01 b	0,02 b
	α -copaeno					
24,91	α -copaeno	0,03 a	0,03 a	0,02 b	0,02 b	0,03 a
	α -ylangeno					
	β -cubebeno					
25,6	β -elemeno	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06
26,83	<i>trans</i> -cariofileno	0,43	0,46	0,37	0,41	0,41
	isocariofileno					
27,25	Calareno	0,33 a	0,34 a	0,28 b	0,27 b	0,37 a
27,49	α -Bergamoteno	0,05	0,07	0,05	0,06	0,06
	α - <i>trans</i> -bergamoteno					
28,15	Não identificado	0,05	0,05	0,04	0,03	0,04
28,31	<i>Cis,cis,cis</i> -1,1,4,8-tetrametil-4,7,10-cicoundecatrieno	0,36	0,38	0,32	0,33	0,31
	α -humuleno					
29,13	Epi-biciclosesquifelandreno	0,10 a	0,10 a	0,08 b	0,07 b	0,10 a
29,26	γ -muroleno	0,07 b	0,08 a	0,06 c	0,06 c	0,07 b
	α -amorfeno					
29,95	Não identificado	0,41 a	0,39 a	0,37 b	0,35 b	0,34 b
30,16	pentadecano	0,51	0,5	0,45	0,43	0,5

Tabela 20, continuação

RT	Compostos possíveis	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
30,26	<i>α</i> -muuroleno Epizonareno <i>γ</i> -selineno <i>β</i> -cadineno	0,31 b	0,37 a	0,28 b	0,26 b	0,34 a
31,23	Miristicina	17,76 a	16,46 b	17,23 a	17,34 a	14,43 c
32,42	Elemicina <i>γ</i> -asarone	1,37	1,18	1,25	1,27	1,19
32,78	<i>cis</i> -nerolidol	0,68 c	1,12 a	0,57 d	0,67 c	0,81 b
33,06	Pentadecano, 3-metil	0,12 a	0,12 a	0,07 b	0,08 b	0,11 a
34,24	Hexadecano	1,32 a	1,46 a	0,91 b	0,97 b	1,23 a
35,44	Dilapiol	21,14 c	19,78 d	23,55 a	22,86 b	19,7 d
36,05	<i>α</i> -cadinol	0,51 b	0,60 a	0,46 b	0,47 b	0,47 b
36,19	Não identificado	1,02 b	1,19 a	0,84 c	0,87 c	0,95 b
37,1	Não identificado	0,75 b	1,24 a	0,58 c	0,82 b	0,88 b
37,86	Apiol	46,02 b	45,00 b	46,79 b	46,15 b	50,20 a
	(3aS,9aS,9bR)-6,6,9aa-trimetil- <i>cis</i> - peridronafto[2,1-b]furan					
	2-isopropil-4,5,6-trimetil-3- nitroanilina					
	<i>cis</i> -isoapiol					
	metil 3-(1-canfenil)propionato					
38,17	Heptadecano	0,93 a	0,91 a	0,58 b	0,66 b	0,82 b
38,39	Pentadecano, 2,6,10,14-tetrametil Heptadecano, 2,6-dimetil Pentadecano, 2,6,10,13-tetrametil	0,33	0,37	0,23	0,26	0,33

Tabela 20, conclusão

RT	Compostos possíveis	Tratamentos				
		Sem elicitar	Solvente	0,5 mM Jasm	2 mM Jasm	8 mM Jasm
	tetracosano, 2,6,10,15,19,23-hexametil					
41,83	Octadecano	0,71 a	0,67 a	0,40 b	0,48 b	0,61 a
	Heptadecano, 7-metil					
42,18	Hexadecano, 2,6,10,14-tetrametil	0,39 a	0,36 a	0,22 b	0,25 b	0,34 a
45,35	Nonadecano	0,41 a	0,36 a	0,23 b	0,27 b	0,33 b
47,35	Ácido hexadecanoico	0,14 a	0,01 b	0,03 b	0,05 b	0,04 b
48,12	Etil 9-hexadecanoato	0,01 c	0,02 c	0,10 a	0,07 b	0,03 c
48,71	Eicosano	0,06 a	0,04 b	0,02 b	0,02 b	0,03 b

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha, não diferem entre si, pelo teste de *Scott Knott* a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)

Os compostos que aumentaram após aplicação do solvente foram: os monoterpenos hidrocarbonados α -terpinene ou δ -2-Carene (pico 9,26), γ -terpinene (pico 10,86) ou δ -Terpinene (pico 12,06); o fenólico hidrocarbonado *p*-cymene ou *m*-cimene ou *o*-cimene (pico 9,53); os monoterpenos oxigenados linalool (pico 12,46), 2-cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans ou 1-terpineol (pico 13,42), 2-cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis ou 1-terpineol (pico 14,19), camphor (pico 14,42), borneol (pico 15,37), 4-terpineol ou (-)- α -terpineol (pico 15,88), (-)- α -terpineol (pico 16,46), trans-piperitol ou cis-piperitol (pico 17,21) e piperitone (pico 19,28); o álcool exo-methyl-camphenilol (pico 14,62); o sesquiterpeno hidrocarbonado γ -muurolene ou α -amorphene (pico 29,26); o sesquiterpeno oxigenado cis-nerolidol (pico 32,78), e os compostos não identificados correspondentes aos picos 36,19 e 37,1 minutos.

Os monoterpenos hidrocarbonados camphene (pico 7,05), α -terpinene ou δ -2-carene (pico 9,26), γ -terpinene (pico 10,86) e δ -terpinene (pico 12,06), bem como o fenólico hidrocarbonado *p*-cymene ou *m*-cimene ou *o*-cimene (pico 9,53), aumentaram após aplicação do solvente e do jasmonato de metila a 2 e 8 mM. Enquanto o sesquiterpeno hidrocarbonado α -cubebene ou α -copaene (pico 23,73) apresentou redução.

O pico 20,81, identificado como bornyl acetate ou isobornyl acetate, apresentou a maior área relativa após aplicação do solvente e do jasmonato de metila a 0,5 e 8 mM.

Após aplicação do solvente e da maior concentração de jasmonato de metila aplicada, o monoterpeno hidrocarbonado trans- β -ocimene ou α -ocimene (pico 10,4), os monoterpenos oxigenados linalool (pico 12,46) e camphor (pico 14,42), o sesquiterpeno hidrocarbonado α -muurolene ou epizonaren ou γ -selinene ou β -cadinene (pico 30,26), bem como o sesquiterpeno oxigenado cis-nerolidol (pico 32,78), aumentaram, enquanto os fenolicos oxigenados

myristicin (pico 31,23) e dillapiole (pico 35,44) reduziram. O myristicin foi menor na maior concentração de jasmonato de metila.

A maior concentração de jasmonato de metila aplicada promoveu a maior área relativa no éster bornyl acetate ou isobornyl acetate (pico 20,81) e no fenólico oxigenado apiole ou (3aS,9aS,9bR)-6,6,9aa-trimethyl-cis-perhydronaphtho[2,1-b]furan ou 2-isopropyl-4,5,6-trimethyl-3-nitroaniline ou cis-isoapiole ou methyl 3-(1-camphenyl)propionate (pico 37,86).

Diversos compostos apresentaram alteração na área relativa após aplicação de jasmonato de metila a 0,5 e 2 mM. Os compostos que aumentaram foram o fenólico oxigenado dillapiole (pico 35,44) e ethyl 9-hexadecanoate (pico 48,12), sendo que ambos foram maiores na concentração de 0,5 mM. Enquanto os compostos que reduziram foram o monoterpene oxigenado borneol (pico 15,37); os sesquiterpenos hidrocarbonados α -copaene ou α -ylangene ou β -cubebene (pico 24,91), calarene (pico 27,25), epi-bicyclosesquiphellandrene (pico 29,13), γ -muurolene ou α -amorphene (pico 29,26); os alcanos pentadecane, 3-methyl (pico 33,06), hexadecane (pico 34,24), octadecane ou heptadecane, 7-methyl (pico 41,83) e hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl (pico 42,18), e os os compostos não identificados correspondentes aos picos 36,19 e 37,1 minutos.

O sesquiterpene oxigenado cis-nerolidol (pico 32,78) apresentou a menor área relativa após a aplicação de jasmonato de metila a 0,5 mM.

O hexadecanoic acid (pico 47,35) e o alcano eicosane (pico 48,71), reduziram após aplicação do solvente e em todas as concentrações de jasmonato de metila. Desses, o hexadecanoic acid apresentou redução de até 93%, em relação às plantas sem elicitar. Por outro lado, os alcanos heptadecane (pico 38,17) e nonadecane (pico 45,35), bem como o composto não identificado correspondente ao pico 29,95 minutos, reduziram somente após aplicação do jasmonato de metila, em todas as concentrações.

A elicitação com MeJA promoveu aumento nos fenólicos presentes nos óleos essenciais como eugenol (KIM et al., 2006).

Os compostos terpênicos são bastante influenciados pelo MeJA. Aumento nos monoterpenos linalol (HUBER et al., 2005; KIM et al., 2006; HARE, 2007) e limoneno (HARE, 2007; ZHAO et al., 2010). Aumentou também os monoterpenos (acetato de bornilo, canfeno, mirceno, α e β -pineno, tricyclene e β -felandreno) e reduziu (E)- β -ocimeno (HUBER et al., 2005). Promoveu ainda, a emissão dos monoterpenos (Z)-3-hexenil acetato, (E)- β -ocimeno e E)-4,8,-dimetil-1, 3,7 nonatrieno (HARE, 2007).

A alteração quantitativa nos metabólitos secundários pela ação do jasmonato de metila tem sido bastante relatada na literatura. Aumentou os diterpenos abietate, levopimarate, palustrate e sandaracopimarate (HUBER et al., 2005) e os triterpenos esqualeno e olean-12-en-3-one (WANG et al., 2010). Aumentou a saponina triterpênica ginsenosídeo em raízes de ginseng (KIM et al., 2004; ALI et al., 2006; KIM et al., 2009), bem como a expressão de genes envolvidos na sua biossíntese (CHOI et al., 2005; KIM et al., 2009).

A aplicação de jasmonato de metila promoveu aumento nos sesquiterpenos α -humuleno, germacreno D, longifolene e (E)-cariofileno (HUBER et al., 2005) e (E)- β -cariofileno, α -bergamoteno, α -humuleno, β -selineno e (E, E)-4,8,12-trimetil-1, 3,7,11 tridecatetraeno (HARE, 2007). Diversos estudos comprovam que o jasmonato de metila é um potente indutor do sesquiterpeno lactonizado artemisinina ou de seus potenciais precursores, como o ácido diidroartemisinico, ácido metil artemisinínico e diidroartemisinina (WANG et al., 2010; AFTAB et al., 2011).

As espécies de gimnospermae são muito influenciadas pelo tratamento com jasmonato de metila, o que significa que esse composto pode oferecer proteção potencial contra herbívoros nas espécies dessa família (MARTIN et al., 2002; MARTIN; GERSHENZON; BOHLMANN, 2003; HEIJARI et al., 2005;

ZULAK et al., 2010). Estimula a produção de geranylgeranyl pirofosfato sintase, bem como aumenta a síntese de monoterpenos e diterpenos no tecido da madeira (MARTIN et al., 2002). Diversas enzimas monoterpeno sintase e diterpeno sintase e seus produtos são induzidos pelo tratamento com MeJA (ZULAK et al., 2010).

Aumenta o acúmulo de monoterpeno e sesquiterpeno e a emissão de terpeno total nas folhas (MARTIN; GERSHENZON; BOHLMANN, 2003). Neste trabalho a composição dos terpenos voláteis emitidos foi muito alterada com a aplicação de MeJA, sendo que o sesquiterpeno (E)- β -farneseno aumentou mais de 100 vezes e os monoterpenos oxigenados (linalol e 1,8-cineol) apresentaram a maior proporção de aumento, representando quase 40% dos monoterpenos totais emitidos. Aumenta ainda, a produção de resina terpenoide e de monoterpenos, com maior concentração de α -pineno (HEIJARI et al., 2005).

4 CONCLUSÃO

A aplicação de 10 g L⁻¹ quitosana reduz o teor de óleo essencial de folhas e de raízes de *Piper mollicomum*, enquanto a menor concentração não altera o teor nas folhas, mas aumentou nas raízes.

A aplicação de quitosana altera qualitativamente e quantitativamente os constituintes do óleo essencial das folhas e apenas quantitativamente das raízes.

Todas as concentrações de quitosana aplicadas, inclusive o solvente alteraram os constituintes do óleo de folhas e raízes.

As maiores concentrações (5 e 10 g L⁻¹) promoveram maiores modificações nos constituintes do óleo de folhas, aumentando ou reduzindo, dependendo do composto.

Nas raízes, a maior parte dos compostos aumentou em função da aplicação de quitosana, mas alguns reduziram. A maior concentração de quitosana promoveu modificações quantitativas em um maior número de compostos em relação aos demais tratamentos, principalmente aumentando-os.

O jasmonato de metila não influenciou no teor do óleo essencial das folhas, entretanto nas raízes a aplicação de jasmonato de metila a 2 mM aumentou o teor.

A composição do óleo das folhas e raízes não foi alterada em termos qualitativos, apenas diferiu quantitativamente após aplicação de jasmonato de metila.

A maior parte dos compostos do óleo das folhas reduziu em função da aplicação de jasmonato de metila, mas alguns aumentaram. O solvente promoveu alteração em um maior número de compostos, reduzindo a maioria e aumentando alguns.

A raiz foi mais influenciada pelos tratamentos com jasmonato de metila que a folha, sendo que o solvente promoveu aumento em um maior número de

compostos. Diversos compostos apresentaram alteração na área relativa após aplicação de jasmonato de metila nas menores concentrações.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido desenvolvidos para que o cultivo de plantas produtoras de metabólitos secundários torne-se economicamente viável. A utilização de eliciadores tem sido amplamente empregada com sucesso para induzir as plantas a aumentar a produção de metabólitos específicos. Nesse contexto, quitosana e jasmonato de metila se destacam como compostos sinalizadores em diversos processos metabólicos.

Como o efeito desses eliciadores é variável em função das espécies, bem como da concentração utilizada, torna-se fundamental importância o desenvolvimento de metodologias que visem o aumento do crescimento e da produção dos metabólitos secundários. Neste trabalho, pode-se verificar que a aplicação de quitosana a 5 g L⁻¹ e com jasmonato de metila a 0,5 mM são eficientes para a produção de óleo essencial, considerando principalmente a produção de dilapiol em raízes de *Piper mollicomum*, acarretando em menor custo de produção, que leva ao aquecimento do mercado e domínio dessa tecnologia pelo país, aumentando assim, a competitividade no mercado internacional.

Vale mencionar, que o interesse da população pela utilização de plantas medicinais tem crescido nos últimos anos, sendo de fundamental importância o fornecimento de produtos de qualidade, que atendam os critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Considerando a aplicação comercial, a quitosana é o eliciador mais viável, uma vez que induziu diversas modificações ecofisiológicas, bioquímicas e anatômicas e é mais vantajoso economicamente, por ser um produto barato, obtido de resíduos de crustáceos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AFSHARYPUOR, S.; JAHROMY, M. M., Constituents of the essential oil from *Tanacetum lingulatum* (Boiss.) Bornm. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, n. 1, p. 74-76, Jan./Mar. 2003.
- AFTAB, T. et al. Role of salicylic acid in promoting salt stress tolerance and enhanced artemisinin production in *artemisia annua* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, n. 4, p. 425-435, Dec. 2011.
- ALI, M. B. et al. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 613-620, June 2006.
- BITTELLI, M. et al. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Agricultural and Forest Meteorology**, Pullman, v. 107, n. 3, p. 167-175, Apr. 2001.
- BLAGOJEVIC, P. et al. Chemical composition of the essential oils of Serbian wild-growing *Srtemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 4780-4789, 2006.
- BRITO, M. R. de; SENNA-VALLE, L. de. Plantas medicinais utilizadas na comunidade Caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 25, n. 2, p. 363-372, abr./jun. 2011.
- BROWSE, J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 183-205, June 2009.

CAI, Z. et al. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 3, p. 461–477, 2012.

CARDEAL, Z. L.; SILVA, M. D. R. G. da; MARRIOTT, P. J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles, rapid commun. **Mass Spectrometry**, London, v. 20, n. 19, p. 2823-2836, 2006.

CHANG, J. H.; SHIN, J. H.; CHUNG, I. S. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, n. 12, p. 1097-1099, Dec. 1998.

CHEN, H. P.; XU, L. L. Isolation and characterization of a novel chitosan-binding protein from non-heading chinese cabbage leaves. **Journal of Integrative Plant Biology**, Ney York, v. 47, n. 4, p. 452-456, Apr. 2005.

CHOI, D. W. et al. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 8, p. 557–566, June 2005.

CORDOVA, S. M. de. et al. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p. 241-244, out./dez. 2010.

CROTEAU, R. et al. Biochemistry of oleoresinosis: monoterpene and diterpene biosynthesis in lodgepole pine saplings infected with *Ceratocystis clavigera* or treated with carbohydrate elicitors. **Plant Physiology**, Washington, v. 85, n. 4, p. 1123-1128, Dec. 1987.

D'AURIA, J. C. et al. Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, New York, v. 49, n. 1, p. 194-207, Jan. 2007.

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, set. 2008.

DUARTE, M. C. T. et al. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec Escherichia coli. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, nesp., p. 139- 143, 2006.

ESTRELA J. L. V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em Sitophilus zeamais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 217-222, fev. 2006.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979.

FAN, G. et al. Chitosan activates defense responses and triterpenoid production in cell suspension cultures of *Betula platyphylla* Suk. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 9, p. 19, p. 2816-2820, May 2010.

FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *piper hispidinervum* C. DC.; *piper aduncum* L. e *tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 113-120, jan./fev. 2005b.

FAZOLIN, M. et al. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 485-489, mar. 2005a.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises estatísticas 4.3**. Lavras: UFLA, 1999.

FLAMINI, G. Essential oils of the aerial parts of three salvia species from Jordan: *salvia lanigera*, *S. spinosa* and *S. syriaca*. **Food Chemistry**, Manchester, v. 100, n. 2, p. 732-735, 2007.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. *Piperaceae* do nordeste brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 1, p. 21-46, 2004.

GUIMARÃES, E. F.; MONTEIRO, D. *Piperaceae* na reserva biológica de poço das antas, silva jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 3, p. 567-587, 2006.

HARE, J. D. Variation in herbivore and methyl jasmonate-induced volatiles among genetic lines of *Datura wrightii*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 11, p. 2028-2043, Nov. 2007.

HEIJARI, J. et al. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 117-124, 2005.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Reviews of Plant Biology**, Michigan, v. 59, p. 41-66, June 2008.

HUBER, D. P. W. et al. Changes in anatomy and terpene chemistry in roots of Douglas-fir seedlings following treatment with methyl jasmonate. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, p. 1075- 1083, June 2005.

JANTAN, et al. A comparative study of the constituents of the essential oils of three *Cinnamomum* species from Malaysia. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, p. 387-391, Nov./Dec. 2003.

JARDIM, J. U. G. **Estudo fitoquímico das raízes de *Piper mollicomum* Kunth**. 2012. 174 f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

JAVIDNIA, K. et al. Composition of the essential oil of *Salvia mirzayanii* Rech. f. & Esfand from Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 17, p. 465-467, 2002.

KAHLOS, K.; KIVIRANTA, J. L. J.; HILTUNEN, R. V. K.. Volatile constituents of wild and in vitro cultivated *Gloeophyllum odoratum*.

Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology, New York, v. 36, n. 4, p. 917-922, July 1994.

KIM, H. J. et al. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 9, p. 3696-701, Sept. 2005.

KIM, Y. S. et al. Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 21, p. 1619-1622, Nov. 2004.

KIM, H. J. et al. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 6, p. 2327-2332, June 2006.

KIM, O. T. et al. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 4, p. 25-33, 2009.

KONIG, W. A. et al. **Terpenoids and related constituents of essential oils**. Germany: University of Hamburg, 2006. Disponível em:
<<http://www.massfinder.com/mfterpenoids.htm>>. Acesso em: 18 abr. 2012.

LAGO, J. H. G. et al. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. lhotzkyanum* (*PIPERACEAE*). **Quimica Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1222-1224, set./out. 2007.

LEI, C. et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2011.

LI, X. R. et al. Comparative analysis of volatile constituents between recipe jingfangsan and its single herbs by GC-MS combined with alternative moving window factor analysis method. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 32, n. 2, p. 258-266, 2009.

LOCKWOOD, G. B. et al. Production of d-limonene in Chitosan elicited citrus Japonica suspension cultures. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, n. 2, p. 113-116, Mar./Apr. 2007.

MAIA, B. H. L. N. S. et al. Essential oils of Toona and Cedrela species (Meliaceae): taxonomic and ecological implications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 6, p. 629-639, Nov./Dec. 2000.

MANDAL, S.; MITRA, A. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 71, n. 4-6, p. 201-209, Oct./Dec. 2007.

MARTIN, D. et al. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, n. 2, p. 1003-1018, Oct. 2002.

MARTIN, D. M.; GERSHENZON, J.; BOHLMANN, J. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. **Plant Physiology**, Washington, v. 132, n. 3, p. 1586-1599, July 2003.

MEDEIROS, M. F. T.; SENNA-VALLE, L. de; ANDREATA, R. H. P. **Flora medicinal dos sitiantes da reserva particular do patrimônio natural Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil: taxonomia e aspectos etnobotânicos**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2005.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medical plants of Brazil**. Rio de Janeiro: Laemmert, 2000.

MUZZARELLI, R. A. A. Some modified chitosans and their niche applications. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. **Chitin handbook**. Italy: Atec, 1997. p. 47-52.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy Review**, Erandwane, v. 1, n. 1, p. 69-79, Jan./May 2007.

NAZ, T.; MOSADDIK, A.; HAQUE, M. E. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Root Extracts of Piper Chaba. **Journal of the Scientific Research**, Tokio, v. 1, n. 1, p. 138-144, 2009.

NIMITMAI, C. **Aroma compounds in processed fingerroot**. 2008. 96 f. Thesis (Associate Professor Siree Chaisere) – Department of Food Science and Technology, Chicago. Disponível em: <<http://research.rdi.ku.ac.th/world/cache/90/ChutiwanNIMAll.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2012.

NOGUEIRA, P. C. L. et al. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae), **Phytochemistry**: chemistry, biochemistry, molecular biology, New York, v. 56, n. 5, p. 443-452, 2001.

NUMAll, S. **Effects of herbs and spices on aroma compounds in rice wine**. 2006. 148 f. Thesis (Associate Professor Siree Chaisere) – Department of Food Science and Technology, Chicago. Disponível em: <<http://research.rdi.ku.ac.th/world/cache/b9/SuhuttayaNUMAll.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2012.

PENEDO, P. L. M. **Estudo sobre a potencialidade da extração de produtos naturais utilizando CO₂ supercrítico**. 2007. 126 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PUTALUN, W. et al. Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, n. 7, p. 1143-1146, 2007.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 3, p. 1457-1465, 2003.

RADULOVIĆ, N.; STOJANOVIĆ, G.; PALIĆ, R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. **PhototherapyResearch**, Nis, v. 20, n. 1, p. 85-88, Jan. 2006.

RAZZAGHI-ABYANEH, M. et al. Dillapiol and Apiol as Specific Inhibitors of the Biosynthesis of Aflatoxin G1 in *Aspergillus parasiticus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 71, n. 9, p. 2329-2332, Sept. 2007.

REDDY, G. V. P.; GUERRERO, A. Interactions of insects pheromones and plant semiochemicals. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 253-261, Jun. 2004.

REIGADA, J. B. **Bioprospeção em espécies de *Piperaceae***. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROSTAD, C. E.; PEREIRA, W. E. Kovats and lee retention indices determined by gas chromatography/mass spectrometry for organic compounds of environmental interest, **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v. 9, n. 6, p. 328-334, June 1986.

RUTHER, J. Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 890, n. 2, p. 313-319, Aug. 2000.

SANTOS, P. R. D. dos. et al. Essential oil analysis of 10 *Piperaceae* species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 58, p. 547–551, 2001.

SASAKI, Y. et al. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **DNA Research**, Tokyo, v. 8, p. 153-161, July 2001.

SCHMIDT, J. M. et al. Abaco bush medicine: chemical composition of the essential oils of four aromatic medicinal plants from abaco Island, Bahamas. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, Birmingham, v. 12, n. 3, p. 43-65, 2006.

SCOTT I, M. et al. A review of Piper spp. (*Piperaceae*) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **PhototherapyResearch**, Nis, v. 7, n. 1, p. 65–75, Jan. 2008.

SEO, W. H.; BAEK, H. H. Identification of characteristic aroma-active compounds from water dropwort (*Oenanthe javanica* DC.). **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 6766-6770, 2005.

SILVA, C. J. et al. Comparative study of the essential oils of seven Melaleuca (*Myrtaceae*) species grown in Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 22, n. 6, p. 474-478, Nov./Dec. 2007.

SIRCAR, D.; MITRA A. Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 4, p. 407-414, Apr. 2008.

SKALTSA, H. D. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 64, n. 3, p. 743-752, Oct. 2003.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. 4. ed. Cary: SAS Institute, 1990.

TELASCREA, M. et al. Essential oil from leaves of *cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 222-232, 2007.

TZAKOU, O. et al. Essential oil analysis of *Teucrium divaricatum* Heldr. ssp. *divaricatum* growing in Greece. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 12, n. 2, p. 113-115, Mar. 1997.

VALLE, R. de C. S. C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**. 2003. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WANG, H. H. et al. Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua*. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 214-218, Mar. 2010.

WASTERNAK, C.; PARTHIER, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 8, p. 302-307, Aug. 1997.

XIE Y.; WANG J.; YANG F.; LEI C. Comparative analysis of essential oil components of two *Cryptomeria* species from China. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 1226-1230.

XU, F. et al. Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba*. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 7, n. 6, p. 721-729, Mar. 2008.

XU, X. et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere, *Atmos. Chemical Physics*, Amsterdam, v. 3, p. 665-682, June 2003.

YASSA, N.; AKHANI, H. **The essential oils composition in two species of the genus *Eriocycla* Lindl. (Apiaceae) from Iran.** Tehran: University of Medical Science, 2008. Disponível em: <<http://biology.ut.ac.ir/members/akhani/PdfReprintNumber/27.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2012.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, New York, v. 23, n. 4, p. 283–333, June 2005.

ZHAO, T. et al. The influence of *Ceratocystis polonica* inoculation and methyl jasmonate application on terpene chemistry of Norway spruce, *Picea abies*. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 71, p. 1332–1341, June 2010.

ZHENG, C. H. et al. Characterization of potent aroma compounds in *Chrysanthemum coronarium* L. (Garland) using aroma extract dilution analysis. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 19, n. 5, p. 401-405, Sept./Oct. 2004.

ZULAK, K. G. et al. Immunofluorescence localization of levopimaradiene/abietadiene synthase in methyl jasmonate treated stems of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) shows activation of diterpenoid biosynthesis in cortical and developing traumatic resin ducts. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 71, n. 14-15, p. 1695-1699, Oct. 2010.