

## **SÍNTESE DE GLICOSÍDEOS DE ESTEVIOL E PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS INDUZIDA POR ELICITORES EM PLANTAS DE ESTEVIA**

**RESUMO:** Atualmente, existe uma demanda global por fontes adicionais de edulcorantes naturais e compostos antioxidantes e as plantas de *Stevia rebaudiana*, além de possuírem edulcorantes, chamados de glicosídeos de esteviol (GSs) também apresentam grande quantidade de compostos fenólicos. Diferentes estratégias são empregadas para otimizar a produção de compostos bioativos, uma dessas é o uso de elicitores. Diante disso, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito de ácido salicílico (AS), metil jasmonato (Meja), paclobutrazol (PBZ) ou espermidina (SPD) atuando como elicitores sobre o conteúdo de glicosídeos de esteviol e pigmentos fotossintéticos em *Stevia rebaudiana*. Inicialmente as plantas de estevia foram cultivadas in vitro e posteriormente passaram para um sistema hidropônico de fluxo contínuo com raízes flutuantes. Os tratamentos foram compostos pelo controle, somente com solução de Hoagland (50%) e os demais contendo a mesma solução adicionados de 100 µM de AS, Meja, PBZ ou SPD. Após 24h da aplicação dos tratamentos, as folhas destas plantas foram coletadas em um período de cinco dias. Nossos resultados mostraram que a exposição das plantas de estevia aos agentes elicitores influenciaram na produção dos GSs, mostrando um efeito positivo no conteúdo de glicosídeos de esteviol totais em todos os tempos de coleta, exceto para PBZ que mostra este efeito somente após 48h de exposição. Em relação aos pigmentos fotossintéticos observou-se que plantas tratadas com AS apresentaram menor conteúdo de *Chl a* e total, por outro lado as plantas tratadas com Meja apresentaram os maiores teores de carotenoides. Estudos como este são de extrema importância, pois abrem novos caminhos a serem explorados em relação à produção dessas fontes naturais de compostos, após a aplicação de diferentes elicitores.

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana*, elicitores, metabólitos secundários.

### **SYNTHESIS OF ESTEVIOL GLYCOSIDES AND PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS INDUCED BY ELICITORS IN ESTEVIA PLANTS**

**ABSTRACT:** Currently, there is a global demand for additional sources of natural sweeteners and antioxidant compounds and *Stevia rebaudiana* plants, besides having sweeteners, called steviol glycosides (SGs) also present a large amount of phenolic compounds. Different strategies are employed to optimize the production of bioactive compounds, one of these is the use of elicitors. The objective of this study was to

determine the effect of salicylic acid (SA), methyl jasmonate (Meja), paclobutrazol (PBZ) or spermidine (SPD) acting as elicitors on the content of steviol glycosides and photosynthetic pigments in *Stevia rebaudiana*. Initially the stevia plants were cultivated in vitro and later passed to a hydroponic continuous flow system with floating roots. The treatments were composed by the control, only with Hoagland solution (50%) and the others containing the same solution added with 100  $\mu$ M of SA, Meja, PBZ or SPD. After 24 h of application of the treatments, the leaves of these plants were collected in a period of five days. Our results showed that the exposure of stevia plants to eliciting agents influenced SGs production, showing a positive effect on total steviol glycosides content at all times, except for PBZ showing this effect only after 48h of exposure. In relation to the photosynthetic pigments, it was observed that plants treated with SA showed lower contents of Chl a and total, on the other hand the plants treated with Meja had the highest levels of carotenoids. Studies such as this are extremely important because generate new perspectives to be explored in relation to the production of these natural sources of compounds after the application of different elicitors.

*Key words: Stevia rebaudiana, elicitors, secondary metabolites.*

## INTRODUÇÃO

A espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni, conhecida como estevia, vem sendo explorada comercialmente e considerada emergente devido ao poder adoçante de um composto oriundo de suas folhas, chamados de glicosídeos de esteviol (GSs) (LEMUS-MONDACA et al., 2012; YADAV; GULERIA, 2012). O esteviosídeo foi relatado ser o mais abundante glicosídeo de estevia e é conhecido por sua doçura (cerca de 200-300 vezes mais doce que a sacarose), enquanto o rebaudiosídeo A (Reb-A) é mais solúvel e dá um sabor que é mais parecido com a sacarose (CEUNEN; GEUNS, 2013).

A biossíntese dos GSs ocorre principalmente nas folhas e compartilha uma via em comum com as giberelinas. A primeira parte consiste na via 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), que produz duas unidades de isopreno, isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) a partir de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (BRANDLE; ROSA, 1992; BEHROOZI et al., 2017). Posteriormente, a fase seguinte resulta na biossíntese do ácido caurenóico através da ação de quatro enzimas: copalil difosfato sintase (CPPS), caurenó sintase (KS), caurenó oxidase (KO) e caurenó ácido hidroxilase (KAH) (HUMPHREY et al., 2006; BRANDLE; TELMER, 2007; YADAV; GULERIA, 2012) e, por último, ocorre a hidroxilação do ácido caurenóico e a glicosilação do esteviol, catalisado por UDP-glicosiltransferases produzindo diferentes GSs (RICHMAN et al., 1999, 2005) (Figura 1).

Além dos GSs, esta planta contém polifenóis, clorofilas e carotenoides que podem ser extraídos para produção de nutracêuticos e alimentos funcionais (KOVAČEVIĆ et al., 2018). A presença de agentes edulcorantes naturais e compostos antioxidantes aumentou a demanda pelas plantas de estevia. No entanto, o cultivo comercial desta planta é limitado pela baixa viabilidade e vigor da semente (DEBNATH et al., 2008). A cultura de tecidos pode fornecer uma grande quantidade de plantas geneticamente uniformes e ajudar a superar muitas das limitações associadas ao método convencional em estevia, além disso, pode ser uma ferramenta que permite estudar a regulação do metabolismo secundário.

Adicionalmente a este método de propagação, várias estratégias biotecnológicas foram formuladas para induzir ou melhorar a biossíntese dos metabólitos secundários em estevia. A este respeito, o cultivo de plantas em meios contendo elicitores tem sido apontado como estimulador da biossíntese de metabólitos secundários (GUPTA et al., 2014; ALVAREZ-ROBLES et al., 2016; BAYRAKTAR et al., 2016; YONEDA et al., 2017). Elicitores podem ser produtos químicos ou biológicos, provenientes das mais diversas formas, que são capazes de induzir alterações morfológicas ou fisiológicas e moleculares no organismo em estudo (ZHAO et al., 2005).

Os fitoreguladores de crescimento são frequentemente usados como elicitores, entre eles os mais estudados são o metil jasmonato (GUNDLACH et al., 1992), ácido salicílico (RODRIGUES-BRANDÃO et al., 2014; LOC et al., 2016) e poliaminas, principalmente espermidina (KAUR-SAWHNEY et al., 2003; LIU et al., 2007), todos de uma forma ou de outra, envolvidos na regulação do crescimento das plantas.

Paclobutrazol (PBZ) ao contrário dos outros reguladores é um retardador do crescimento da planta que também poderia aliviar os danos causados pelo estresse (FLETCHER et al., 2000; WANG; LIN, 2016). O efeito da PBZ sobre o crescimento da planta é exercido através da inibição da biossíntese de giberelinas, pois age bloqueando a ação da enzima caureno oxidase que catalisa a oxidação do caureno a ácido caurenoico (FLETCHER et al., 2000; HAJIHASHEMI; EHSANPOUR, 2013).

Considerando a importância da estevia no cenário mundial e de estudos que visem ampliar os conhecimentos sobre esta espécie, o presente trabalho avaliou o efeito do uso de quatro reguladores de crescimento (metil jasmonato, ácido salicílico, espermidina e paclobutrazol) atuando como elicitores sobre o conteúdo de glicosídeos de esteviol e pigmentos fotossintéticos.

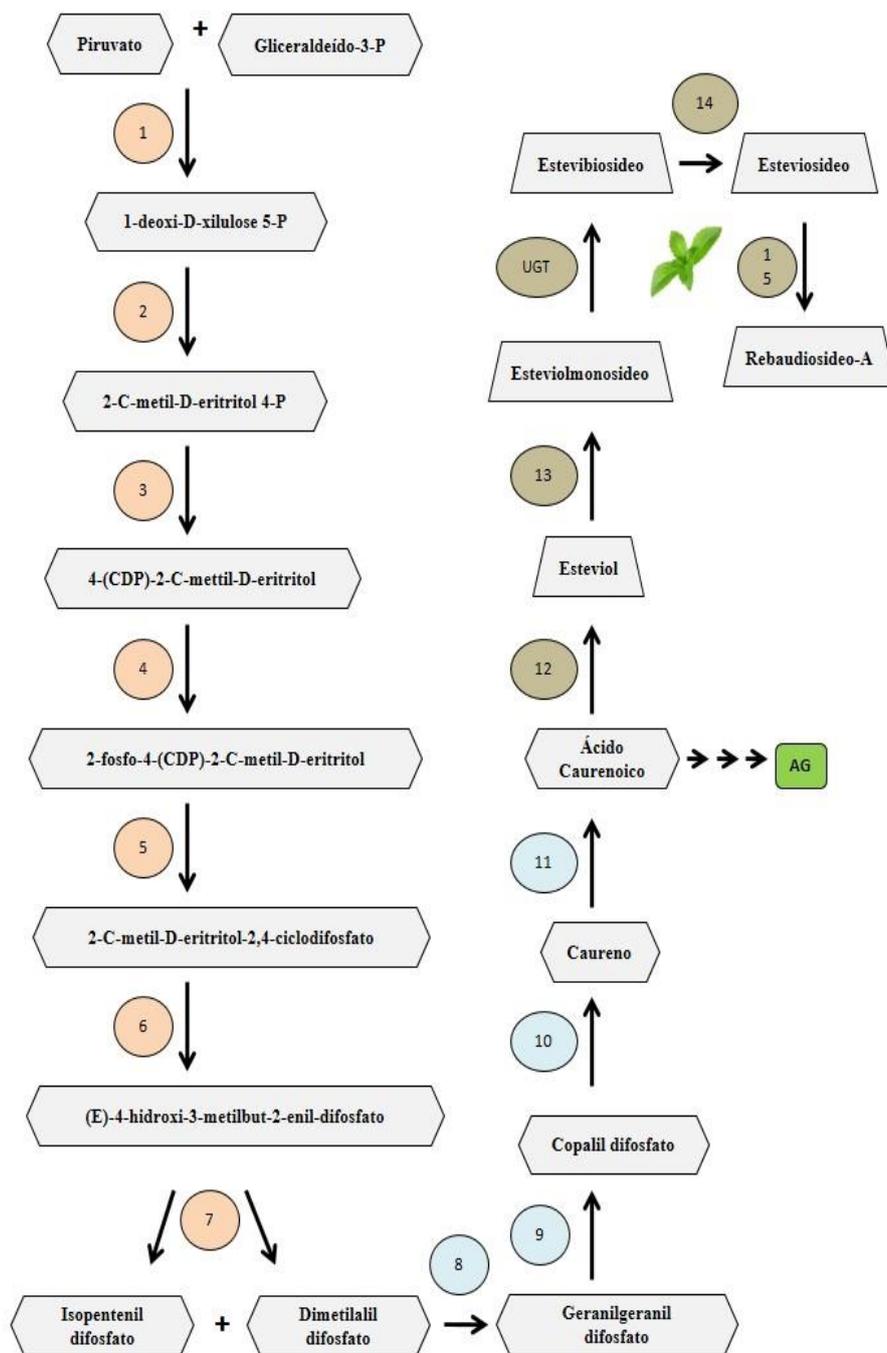


Figura 1. Modelo representativo mostrando a via de biossíntese dos GSs em *Stevia rebaudiana*. Os números circundados representam a enzima catalisando o passo de reação correspondente: (1) DXS: 1-deoxixilulose 5-fosfato sintase; (2) DXR: 1-deoxixilulose 5-fosfato redutase; (3) CMS: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintase; (4) CMK: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol kinase; (5) MCS: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase; (6) HDS: 1- hidroxi-2-metil-2(E)-butenil-4-difosfato sintase; (7) HDR: 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil-4-difosfato redutase; (8) GGDPs: geranilgeranil difosfato sintase; (9) CDPS: copalil difosfato sintase; (10) KS: caureno sintase; (11) KO: caureno oxidase; (12) KAH: caureno ácido hidroxilase; (13) UGT85C2: UDP glicosiltransferase-85C2; (14) UGT74G1: UDP glicosiltransferase-74G1; (15) UGT76G1: UDP glicosiltransferase-76G1; AG- ácido giberélico. Adaptado de Modi et al. (2013).

Figure 1. Representative model showing the SGs biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana*. The numbers circled represent the enzyme catalyzing the corresponding reaction step. (1) DXS: Deoxyxyulose5-phosphate synthase, (2) DXR: deoxyxyulose-5-phosphate reductase, (3) CMS: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol synthase, (4) CMK: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol kinase, (5) MCS: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, (6) HDS: 1- hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphate synthase, (7) HDR: 1-hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl-4-diphosphate reductase, (8) GGDPs: geranylgeranyl diphosphate synthase, (9) CDPS: copalyl diphosphate synthase, (10) KS: kaurene synthase, (11) KO: kaurene oxidase, (12) KAH: kaurenoic acid hydroxylase, (13) UGT85C2: UDP glucosyltransferase-85C2, (14) UGT74G1: UDP glucosyltransferase 74G1, (15) UGT76G1: UDP glucosyltransferase-76G1; GA: Giberélico acid. Source: Adapted from Modi et al. (2013).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal e tratamentos com os compostos elicitores**

Plantas de *Stevia rebaudiana* foram estabelecidas in vitro e micropropagadas em meio basal MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e 1 mL L<sup>-1</sup> de Plant Preservative Mixture™. Todas as culturas foram mantidas a 25 ± 2 °C em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 h. Após 30 dias, as plantas de estevia cultivadas in vitro foram lavadas para eliminar o meio de cultura aderido às raízes e em seguida transferidas para bandejas plásticas (20 x 7 x 3 cm), contendo os substratos Plantmax® e vermiculita (1: 1). As plantas foram irrigadas a cada dois dias e a cada três dias com solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) por 30 dias em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 25 °C ± 1. Posteriormente, essas plantas foram transferidas para um sistema hidropônico de fluxo contínuo com raízes flutuantes contendo solução de Hoagland (50%) por dois dias, para aclimatar as raízes ao sistema.

O tratamento controle foi solução de Hoagland de meia-força (T1), e os tratamentos com elicitor consistiram da mesma solução suplementada com 100 µM de - metil jasmonato (T2), espermidina (T3), ácido salicílico (T4) ou de paclobutrazol (T5) (Figura 2). Folhas dessas plantas foram coletadas separadamente em intervalos de 24, 48 e 96 horas e armazenadas em nitrogênio líquido para o processo de liofilização das amostras.

### **Análises do conteúdo de glicosídeos de esteviol**

Amostras liofilizadas foram colocadas em tubos de tampa de rosca e homogeneizadas usando um micropistilo em 3 mL de etanol a 70%. A extração foi realizada em banho ultrassônico, onde as amostras foram mantidas por 30 minutos a uma temperatura de 80 °C. Posteriormente, a centrifugação foi realizada a 15.000 x g<sub>max</sub> em 4 °C por 5 minutos e os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -20 °C até que as determinações fossem realizadas. Os testes foram realizados em quatro repetições.

As análises de RP-HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa) foram realizadas com um sistema de cromatografia líquida equipado com um

módulo de separação Waters Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, EUA), um detector de arranjo de diodos de comprimento de onda variável Waters 2996 e controlado pela Empower Software Pro. Utilizou-se uma coluna de fase inversa Luna C-18 (250 mm x 4 mm, 5 µm de tamanho de partícula) fornecida por Phenomenex. A separação foi realizada a 40 °C, conforme descrito por JECFA (2010), utilizando condições isocráticas. A fase móvel consistia em acetonitrilo: tampão fosfato 10 mM, pH 2,6 (32:68 v/v). A taxa de fluxo foi de 1 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 10µL. A identificação dos compostos presentes nos extratos foi feita comparando os tempos de retenção e os espectros UV com os de um padrão de rebaudiosídeo A (Sigma-Aldrich) e com dados da literatura. Para fins de comparação, os cromatogramas foram obtidos a 210nm e a quantificação dos analitos nas amostras foi realizada usando o método padrão externo. Os resultados de quantificação de esteviosídeo, dulcosídeo e glicosídeos de esteviol totais foram expressos em conteúdo relativo.

### **Teor de clorofilas e carotenoides**

Tanto as clorofilas (a e b) como os carotenoides nas folhas de estevia foram mensurados como descrito anteriormente por López-Orenes et al. (2013b). A absorvância dos extratos etanólicos foi medida a 440, 644 e 662nm utilizando um espectrofotometro Shimadzu UV-1603 e etanol 70% como branco. As seguintes equações foram usadas para o cálculo da concentração de cada pigmento:  $Chl\ a = (15,65 * Abs_{666}) - (7,34 * Abs_{653})$ ;  $Chl\ b = (27,05 * Abs_{653}) - (11,21 * Abs_{666})$ ;  $Chl\ total = (Chl\ a + Chl\ b)$  e  $Carotenoides = ((1000 * Abs_{470}) - (2,86 * Chl\ a) - (129,02 * Chl\ b)) / 245$  e os dados são apresentados em µmol de composto por g<sup>-1</sup> de massa seca).

### **Análise de dados**

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x3, com quatro agentes elicitores e um controle (sem elicitores) e três períodos de exposição aos tratamentos correspondentes. Para cada combinação, foram realizadas três repetições biológicas, das quais cada uma consistiu de um vaso com cinco plantas. Os resultados correspondem à média ± desvio padrão. Para as análises estatísticas, testes de análise de variância (ANOVA) e Duncan foram realizados para calcular diferenças significativas em tratamentos e tempos de exposição, usando o software R. P<0,05.

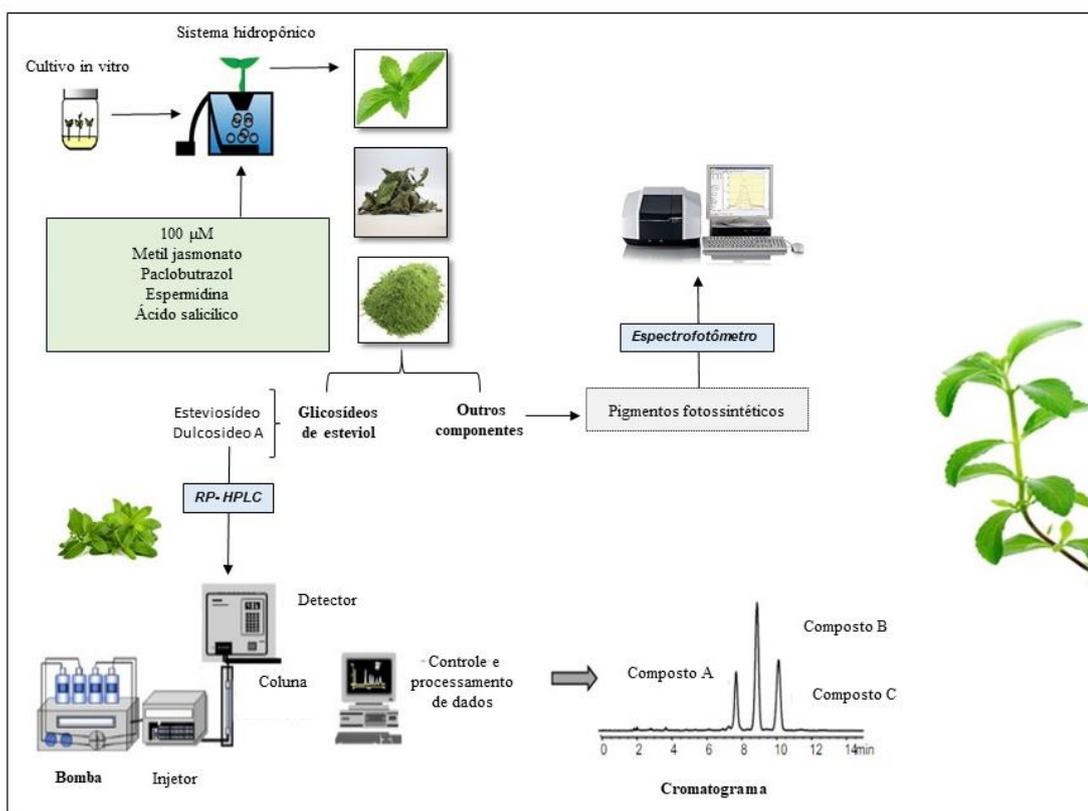


Figura 2. Modelo esquemático da metodologia utilizada para a realização do trabalho  
 Figure 2- Schematic representation of the methodology used to perform the work

## RESULTADOS

A quantidade e qualidade dos GSs são influenciadas pelo genótipo, métodos de propagação, condições ambientais e práticas agrônômicas (BRANDLE; ROSA, 1992). Neste estudo as áreas de pico foram quantificadas para estabelecer os níveis de GSs (esteviosídeo e outros compostos da mesma natureza) que poderiam ser detectados por HPLC em cada um dos tratamentos avaliados. Diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos, entretanto nenhum dos compostos químicos avaliados propiciou um aumento significativo no conteúdo relativo de esteviosídeo e dulcosídeo A (Tabela 1). Quando as plantas foram tratadas com SPD e AS observaram-se os menores conteúdos relativos de esteviosídeo ( $0,754 \pm 0,05$  e  $0,713 \pm 0,04$ , respectivamente), já quando o parâmetro avaliado foi o conteúdo relativo de dulcosídeo A, foi o PBZ que proporcionou os menores índices ( $0,113 \pm 0,10$ ). A aplicação dos elicitores MeJa, PBZ, AS ou SPD propiciaram um aumento no conteúdo de glicosídeos de esteviol totais em todos os tempos de exposição, exceto para PBZ que só mostrou este incremento nas plantas de estevia após 48h horas de exposição.

Tabela 1. Conteúdo relativo de glicosídeos de esteviol ( $\mu\text{g}$  de Reb A por  $\text{g}^{-1}$  massa seca) em folhas de *Stevia rebaudiana* elicitadas com paclobutrazol (PBZ), espermidina (SPD), metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS) durante três tempos de exposição (24, 48, and 96h).

Table 1. Relative content of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves elicited with paclobutrazol (PBZ), spermidine (SPD), methyl jasmonate (MeJa) and salicylic acid (AS) during three exposure times (24, 48, and 96h).

Glicosídeos de esteviol (GSs)	Tempo (h)	Elicidores				
		Controle	PBZ	SPD	MeJa	AS
Esteviosídeo	24	1,0 ABa	0,85±0,18 Ba	0,79±0,09 Bb	1,18±0,15 Aa	1,02±0,14 ABa
Esteviosídeo	48	1,0 Aa	1,05±0,08 Aa	1,14±0,15 Aa	0,93±0,07 Ab	1,08±0,20 Aa
Esteviosídeo	96	1,0 Aa	1,03±0,19 Aa	0,75±0,05 Bb	0,94±0,06 ABb	0,71±0,04 Bb
Dulcosídeo A	24	1,0 Aa	0,11±0,10 Bb	0,84±0,17 Aa	1,18±0,22 Aa	0,95±0,21 Aa
Dulcosídeo A	48	1,0 ABa	0,80±0,30 Ba	1,17±0,11 Aa	0,97±0,10 ABa	0,99±0,07 ABa
Dulcosídeo A	96	1,0 Aa	1,02±0,25 Aa	0,87±0,21 Aa	1,07±0,31 Aa	1,23±0,27 Aa
GSs totais	24	1,0 Ca	0,96±0,24 Cb	1,64±0,26 Bb	2,36±0,37 Aa	1,98±0,38 ABa
GSs totais	48	1,0 Ba	1,86±0,53 Aa	2,32±0,14 Aa	1,90±0,11 Ab	2,08±0,21 Aa
GSs totais	96	1,0 Ba	2,06±0,54 Aa	1,62±0,23 Ab	2,01±0,37 Aab	1,94±0,24 Aa

\*Cada ponto de dados representa as medições de cinco plantas individuais por repetição. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos para o mesmo tempo, enquanto letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tempos para o mesmo tratamento (Teste de Duncan  $P \leq 0,05$ ).

O conteúdo e a relação entre os pigmentos fotossintéticos podem ser considerados como um bom indicador de vitalidade em plantas superiores, uma vez que representam uma medida da atividade fotossintética (LÓPEZ-ORENES et al., 2013b). Neste sentido o presente estudo avaliou o efeito dos diferentes elicitores nos teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenoides totais) e os resultados são demonstrados na Tabela 2. De um modo geral, o teor de clorofila (a, b e total) foi afetado pelos tratamentos, principalmente após 48h, enquanto que o conteúdo de carotenoides apresentou maiores diferenças após 24 e 96 h de exposição aos tratamentos.

As plantas tratadas com PBZ apresentaram o maior teor de *Chl a* após 48h de exposição ( $1,576 \pm 140,51 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca), entretanto, não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento controle, já as plantas tratadas com AS apresentaram o menor conteúdo de *Chl a* ( $0,829 \pm 119,00 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca).

Em relação aos teores totais de clorofila às 48h, os maiores valores foram observados nas plantas controle e tratadas com PBZ ( $2,742 \pm 40,71$  e  $3,054 \pm 224,45 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca, respectivamente) e o menor valor nas plantas tratadas com AS ( $1,755 \pm 144,73 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca).

Tabela 2. Conteúdo de pigmentos fotossintéticos - Chl a, Chl b e Chl total (a+b) e carotenoides totais (Car totais) ( $\mu\text{mol}$  de composto por  $\text{g}^{-1}$  massa seca) - em folhas de *Stevia rebaudiana* elicitadas com paclobutrazol (PBZ), espermidina (SPD), metil jasmonato (MeJa) e ácido salicílico (AS) durante três tempos de exposição (24, 48, e 96 h).

Table 2. Content of photosynthetic pigments in *Stevia rebaudiana* leaves elicited with paclobutrazol (PBZ), spermidine (SPD), methyl jasmonate (MeJa) and salicylic acid (AS) during three exposure times (24, 48, and 96h).

Pigmentos fotossintéticos	Tempo (h)	Elicitores				
		Controle	PBZ	SPD	MeJa	AS
Chl a	24	1,36±49,2Aa	1,35±212,5Aa	1,07±26,7Aa	1,14±83,2Aa	0,75±26,5 Aa
Chl a	48	1,52±25,3Aa	1,57±140,5Aa	1,41±83,2ABa	1,00±82,6ABa	0,82±119,0Ba
Chl a	96	1,69±26,9Aa	1,84±20,2Aa	1,51±12,6Aa	1,25±10,5Aa	1,32±13,80Aa
Chl b	24	1,17±21,9Aa	1,18±159,7Aa	1,13±38,9Aa	1,12±21,2Aa	0,83±26,5Aa
Chl b	48	1,22±15,5AB	1,47±84,1Aa	1,25±63,7ABa	1,21±63,9ABa	0,92±25,7Ba
Chl b	96	1,38±26,2Aa	1,55±13,5Aa	1,28±12,4Aa	1,16±15,3Aa	1,16±10,7Aa
Chl total	24	2,54±30,0Aa	2,53±372,5Aa	2,21±31,2Aa	2,27±102,1Aa	1,59±53,0 Aa
Chl total	48	2,74±40,7Aa	3,05±224,4Aa	2,67±146,9ABa	2,21±146,5ABa	1,75±144,7Ba
Chl total	96	3,07±44,5Aa	3,39±33,2Aa	2,79±23,6Aa	2,48±24,5Aa	2,48±21,6Aa
Car totais	24	71,23±7,8AB	21,57±5,6Cb	80,81±10,7Aa	24,94±6,2BCb	45,43±9,4ABCa
Car totais	48	38,03±4,7Aa	72,85±2,2Aa	35,22±3,5Aa	43,71±2,8Ab	52,61±8,0Aa
Car totais	96	42,29±2,8Ba	77,20±15,1Ba	54,78±1,8Ba	152,81±11,0Aa	54,15±1,2Ba

\*Cada ponto de dados representa as medições de cinco plantas individuais por repetição. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos para o mesmo tempo, enquanto letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tempos para o mesmo tratamento (Teste de Duncan  $P \leq 0.05$ )

No presente estudo, variações significativas foram observadas na concentração de carotenoides. Plantas tratadas com MeJa apresentaram o maior nível desses pigmentos às 96h ( $152,81 \pm 11,00 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca), sendo superiores aos demais tratamentos. Em relação aos diferentes tempos de exposição, as plantas tratadas com MeJa e PBZ apresentaram a mesma tendência, com baixo teor de carotenoides às 24 h ( $24,94 \pm 6,20$  e  $21,57 \pm 5,62 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca, respectivamente) e aumento nas 96 h ( $152,81 \pm 11,00$  e  $77,20 \pm 15,14 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca, respectivamente).

## DISCUSSÃO

Os conteúdos de glicosídeos de esteviol (GSs) foram investigados usando Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC). Segundo Lemus-Mondaca et al. (2012) os quatro principais GSs são o esteviosídeo, o rebaudiosídeo A, o rebaudiosídeo C e o dulcosídeo A. No presente estudo, observou-se que

independente dos tratamentos aplicados, os dois principais componentes identificados em estevia foram o esteviosídeo e o dulcosídeo A.

De acordo com Dey et al. (2013) o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A são os compostos majoritários presentes nos extratos de estevia, entretanto no presente estudo os níveis de rebaudiosídeo A foram predominantemente baixos e impossíveis de serem quantificados. Em estudo visando analisar a influência dos elicitores MeJa, AS, SPD e PBZ sobre a expressão dos genes que codificam para as enzimas que fazem parte da rota de biossíntese dos GSs, em estevia, Lucho et al. (2018) verificaram que mesmo quando ocorreu aumento na expressão do gene *UGT76G1* (gene que codifica para a enzima responsável pela conversão do esteviosídeo em rebaudiosídeo A) não foi possível observar mudanças no conteúdo de rebaudiosídeo A, em plantas de estevia. Os autores salientaram que possivelmente a síntese deste composto não seja apenas regulada no nível transcricional, mas também envolvem regulação pós-transcricional, traducional e pós-traducional. Neste sentido mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo por trás do baixo acúmulo de rebaudiosídeo A observado em alguns genótipos de estevia.

Os resultados também indicaram que a aplicação de elicitores afeta não apenas o conteúdo de GSs totais, mas também o conteúdo de pigmentos fotossintéticos como pode ser visto na Tabela 2. De acordo com Yadav; Guleria, (2012) o esteviol que dá origem aos diferentes GSs é sintetizado na via MEP (2-C-metil-d-eritritol 4-fosfato) - a mesma via que suporta a síntese dos pigmentos fotossintéticos, então é possível que os compostos elicitores avaliados podem também estar influenciando a síntese destes pigmentos. A aplicação exógena de elicitores influencia no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos conforme observado, embora nenhum dos compostos avaliados propicie um aumento, exceto para carotenoides. Neste sentido futuras pesquisas devem ser realizadas tendo em conta diferentes doses, formas de aplicação e tempos de exposição a fim de investigar os possíveis efeitos benéficos da aplicação exógena de agentes elicitores sobre o aumento do conteúdo de pigmentos fotossintéticos e se esses efeitos se correlacionam com uma maior capacidade fotossintética nas plantas elicidadas.

Quando as plantas de estevia foram tratadas com AS, não foi observado incremento no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, sendo sua aplicação até prejudicial no caso de *Chl a* e total. Contrariamente a esses resultados, López-Orenes et al. (2013a) relataram um efeito positivo do AS aplicado exogenamente no conteúdo total de Clorofilas e carotenoides em *Cistus heterophyllus*. Estes resultados

aparentemente contraditórios confirmam que AS exerce uma influência sobre os níveis de pigmentos fotossintéticos, embora os efeitos resultantes estejam intimamente relacionados com as espécies.

Em relação ao conteúdo de carotenoides foi observado, no presente estudo, um aumento significativo quando as plantas foram tratadas com Metil jasmonato. Este resultado é similar aos relatados por Poonam et al. (2013) em *Cajanus cajan*. Segundo Mlodzińska et al. (2009) os carotenoides são uma grande família de pigmentos terpenoides, assim como os glicosídeos de esteviol. A biossíntese de glicosídeos de esteviol e de pigmentos fotossintéticos provém dos mesmos precursores, isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), logo, as condições ideais para a produção de ambos são as mesmas, isto justifica em parte o efeito positivo do Meja em relação à produção dos GSs e de carotenoides observada neste estudo.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a síntese dos GSs é influenciada pela aplicação exógena de elicitores, principalmente no que diz respeito aos glicosídeos de esteviol totais, assim como o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos. Plantas tratadas com AS apresentam os menores conteúdos de *Chl a* e total, enquanto Meja propicia um aumento no conteúdo de GSs totais e carotenoides. A aplicação de elicitores é uma abordagem promissora para o aumento dos glicosídeos de esteviol e carotenoides.

**AGRADECIMENTOS:** Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo seu apoio financeiro e bolsa de pesquisa de EJBB, à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior) e à FAPERGS (Fundação de Pesquisa do Rio Grande do Sul) por apoiar a pesquisa. Parte deste trabalho foi realizada no Instituto de Biotecnologia Vegetal, UPCT/Espanha.

## REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-ROBLES, M.J.; LÓPEZ-ORENES, A.; FERRER, M.A.; CALDERÓN, A.A.  
Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in

*Stevia rebaudiana* shoot cultures. *Industrial Crops and Products*, v.87, p.273-279, 2016.

BAYRAKTAR, M.; NAZIRI, E.; HAKKI, I.; FATIH, A. Elicitor induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, v.127, p.289-300, 2016.

BEHROOZI, P.; BAGHIZADEH, A.; SAEI, A.; KHARAZMI, S. Quantitative analysis of Uridine diphosphate glycosyltransferase UGT85C2, UGT74G1 and UGT76G1 genes expression in *Stevia rebaudiana* under different irrigations. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 64, p.67-72, 2017.

BRANDLE, J.E.; ROSA, N. Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science*, v.72, p.1263-1266, 1992.

BRANDLE, J.E.; TELMER, P.G. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, v.68, p.1855-1863, 2007.

CEUNEN, S.; GEUNS, J.M.C. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *Journal of Natural Products*, v.76, p.1201-1228, 2013.

DEBNATH, M. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.2, p.45-51, 2008.

DEY, A.; KUNDU, S.; BANDYOPADHYAY, A.; BHATTACHARJEE, A. Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Comptes rendus biologiques*, v.336, p.17–28, 2013.

FLETCHER, R.; GILLEY, A.; SANKHLAM, N.; DAVIS, T.D. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural Reviews*, v.2, p.55-138, 2000.

GUNDLACH, H.; MÜLLER, M.J.; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.89, p.2389-2393, 1992.

GUPTA, P.; SHARMA, S.; SAXENA, S. Effect of abiotic stress on growth parameters and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) raised in vitro. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v.3, p.160-167, 2016.

HAJIHASHEMI, S.; GEUNS, J.M.C.; EHSANPOUR, A.A. Gene transcription of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni under polyethylene glycol, paclobutrazol and gibberellic acid treatments in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.35, p.2009-2014, 2013.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif Agric Exp Stn Circ*, v.347, p.1-32, 1950.

HUMPHREY, T.V.; RICHMAN, A.S.; MENASSA, R.; BRANDLE, J.E. Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. *Plant Molecular Biology*, v.61, p.47–62, 2006.

JECFA, 2010. Steviol glycosides. In: *Compendium of Food Additive Specifications*. FAO JECFA Monographs 10:17–21.

KAUR-SAWHNEY, R.; TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T.; GALSTON, A.W. Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*, v.2, p.1-12, 2003.

KIANG, N.Y.; SIEFERT, J.; BLANKENSHIP, R.E. Spectral signatures of photosynthesis. I. Review of earth organisms. *Astrobiology*, v.7, p.222–251, 2007.

Kovačević, D.B.; Maras, M.; Barba, F.J.; Granato, D.; Roohinejad, D.S.; Mallikarjunan, K.; Montesano, D.; Lorenzo, J.M.; Putnik, P. Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: A review. *Food Chemistry*, v.268, p.513-521, 2018.

LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; KONG, A.H. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive

review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, v.132, p.1121-1132, 2012.

LIU, J.H.; KITASHIBA, H.; WANG, J.; BAN, Y.; MORIGUCHI, T. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology Journal*, v.24, p.117-126, 2007.

LOC, N.H.; GIANG, N.T.; HUY, N.D. Effect of salicylic acid on expression level of genes related with isoprenoid pathway in centella (*Centella asiatica* (L.) Urban) cells. *Journal of Biotechnology*, v.6, p.1-7, 2016.

LÓPEZ-ORENES, A.; MARTÍNEZ-MORENO, J.M.; CALDERÓN, A.A.; FERRER, M.A. Changes in phenolic metabolism in salicylic acid-treated shoots of *Cistus heterophyllus*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, v113,p.417-427, 2013a.

LÓPEZ-ORENES, A.; ROS-MARÍN, A.F.; FERRER, M.A.; CALDERÓN, A.A. Antioxidant capacity as a marker for assessing the in vitro performance of the endangered *Cistus heterophyllus*. *Sci World J*, 2013b.

LUCHO, S.R.; AMARAL, M.N.; MILECH, C.; FERRER, M.A.; CALDERÓN, A.A.; BIANCHI, V.J.; BRAGA, E.J.B. Elicitor-induced transcriptional changes of genes of the steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J Plant Growth Regul*, v.37, p.1–15, 2018.

MODI, A.R.; RAJ, S.; KANANI, P.; PATEL, A.; NARAYANAN, S. Analysis of differentially expressed genes involved in stevioside biosynthesis in cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni treated with Steviol as an immediate precursor. *Journal Plant Growth Regulation*, v.33, p.1-8, 2013.

MLODZIŃSKA, E. Survey of plant pigments: molecular and environmental determinants of plant colors. *Acta biologica cracoviensia*, v.51, p.7-16, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissues. *Physiol. Plant*, v.15, p.473-497, 1962.

POONAM, S.; KAUR, H.; GEETIKA, S. Effect of jasmonic acid on photosynthetic pigments and stress markers in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. seedlings under copper stress. *Am. J. Plant Sci*, v.4,p. 817-823, 2013.

RODRIGUES-BRANDÃO, I.; KLEINOWSKI, A.M.; MILLECH, A.E.; LIMA, M.C.; AMARANTE, L.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin in production from leaves of *Alternanthera tenella*. *Ciência Rural*, v.44, p.1893-1898, 2014.

YADAV, S.K.; GULERIA, P. Steviol Glycosides from Stevia : Biosynthesis Pathway Review and their Application in Foods and Medicine. *Crit Rev Food Sci Nutr*, v.52, p.988-998, 2012.

WANG, A.L.; LIN, C. The effect of Paclobutrazol on physiological and biochemical changes in the primary roots of pea. *Journal Experimental Botany*, v.43, p.1367-1372, 2016.

YONEDA, Y.; NAKASHIMA, H.; MIYASAKA, J.; OHDOI, K.; SHIMIZU, H. Impact of blue, red, and far-red light treatments on gene expression and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, v.137, p.1-9, 2017.

ZHAO, J.T.; DAVIS, L.C.; VERPOORTER, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v.23, p.283-333, 2005.