



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA CÉLIA DA SILVA

**RIZOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE *Morinda citrifolia* L. SOB
EFEITO DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO E DE ELICITORES**

FORTALEZA - CE

2021

ANA CÉLIA DA SILVA

**RIZOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE *Morinda citrifolia* L. SOB
EFEITO DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO E DE ELICITORES**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.

FORTALEZA- CE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S578r Silva, Ana Célia da.
Rizogênese em explantes foliares de *Morinda citrifolia* L. sob efeito de ácido indolbutírico e de elicitores / Ana Célia da Silva. – 2023.
49 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.
1. Noni. 2. Elicitor. 3. Cultivo in vitro. I. Título.

CDD 570

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter me dado forças para enfrentar com sabedoria as dificuldades da vida, por ter me feito enxergar que sou uma pessoa muito forte, que tudo o que eu quiser eu poderei conseguir. Agradeço também por ter me presenteado com a minha mãe, e com meu filho Conrado, obrigada DEUS.

À minha mãe que sonhou junto a mim e que é a principal responsável pelas conquistas positivas em minha vida. Agradeço a ela por ter me apoiado nos vários momentos em que pensei em desistir, em que estive desesperada diante das dificuldades. Agradeço a ela por tudo. Mãe, sem você tudo teria sido infinitamente mais difícil. Eu amo a senhora, Maria Nilza da Silva.

À minha orientadora, professora Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho, por ter aberto as portas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal para realização deste trabalho. Pela imensa ajuda, paciência para comigo durante os últimos dois anos, muito obrigada.

Ao professor Dr. Hermógenes David de Oliveira, por ter aceito fazer parte da banca de avaliação.

Ao meu coorientador Emanuel Alves, pela grande ajuda durante os experimentos, pela força e companheirismo.

Agradeço a minha irmã Juscélia pelo grande auxílio, durante esses mais de quatro anos cuidando imensamente bem do meu filho Conrado, não tenho palavras para agradecer minha irmã.

Ao meu esposo Marcos Oliveira pela força e ajuda nos momentos mais difíceis quando pensei em desistir, segurou minha mão, me abraçou e fez ter certeza que sim, eu conseguiria.

Aos meus amigos Victória e Felipe, pela força e apoio sempre.

As instituições: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo apoio financeiro aos projetos durante minha graduação.

ANA CÉLIA DA SILVA

**RIZOGÊNESE EM EXPLANTES FOLIARES DE *Morinda citrifolia* L. SOB
EFEITO DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO E DE ELICITORES**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 02/09/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Emanuel Alves Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

RESUMO

O noni (*Morinda citrifolia* L.) é conhecido por seus amplos relatos de seus benefícios terapêuticos relacionados aos compostos presentes em diferentes partes da planta. O cultivo *in vitro* de plantas tem ganhado destaque nos últimos anos e suas técnicas já são aplicadas em diferentes espécies de plantas. Diante disso, o trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito dos elicitores metil jasmonato (MJ) e ácido salicílico (AS) no processo de rizogênese do noni, induzido por ácido indolbutírico (AIB). O experimento foi conduzido da seguinte forma: explantes foliares obtidos de uma planta cultivada *in vitro* por 6 meses foram inoculados em meio de cultura, *Wood Plant Medium* (WPM) suplementado com sacarose (2%), ágar (0,7%) e 1,0 mg/L de (AIB) com 4 repetições por tratamento e mantidas sob fotoperíodo de 16h de luz e temperatura de 25 ° C. Em seguida as raízes formadas foram transferidas para erlenmeyer com meio WPM líquido na presença e ausência de AIB (1,0 mg/L), MJ (0,2 mg/L) e AS (0,1 mg/L). Além do tratamento controle, foram utilizados 14 tratamentos, sendo 7 na presença de AIB e 7 na ausência de AIB. Ao final de 28 dias foram avaliados o peso fresco e comprimento das raízes formadas. O melhor tratamento foi o meio WPM contendo MJ 0,1 mg/L. Um segundo experimento com o objetivo de avaliar o efeito do AIB e MJ na rizogênese do noni foi realizado. Com os seguintes tratamentos: 1) controle (meio WPM desprovido de AIB e MJ); 2) WPM com 1,0 mg/L de AIB; 3) WPM com 0,1 mg/L de MJ; 4) WPM com 1,0mg/L de AIB e 0,1 m/L de MJ. Após 28 dias a biomassa foi utilizada para realização dos ensaios bioquímicos: quantificação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), avaliação das enzimas peroxidase de guaiacol (POX), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) e avaliar o conteúdo de pigmentos fotossintéticos. A maior quantificação de proteínas totais foi obtida em meio WPM com 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB, apresentando 0,24 mgP/mL de proteínas totais. As enzimas POX, CAT e APX não apresentaram diferenças significativas. A concentração de peróxido de hidrogênio foi maior em meio WPM contendo 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB, com 1709,44 uM/gmf. Para carotenoides o melhor tratamento foi meio WPM suplementado com 0,1 mg/L de MJ na presença de AIB, que resultou na concentração de 8,62 ug/mL. Assim, pode-se concluir que os explantes foliares de noni submetidos ao efeito do AIB induzem a rizogênese, e que as raízes submetidas ao efeito de AIB e ao elicitador MJ são capazes de aumentar a biomassa de *M. citrifolia* L.

Palavras chaves: Noni; elicitador; cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Noni (*Morinda citrifolia* L.) is known for its wide reports of its therapeutic benefits related to compounds present in different parts of the plant. In vitro plant cultivation has gained prominence in recent years and its techniques are already applied to different plant species. Therefore, the objective of the work was to evaluate the effect of the elicitors methyl jasmonate (MJ) and salicylic acid (SA) on the noni rhizogenesis process, induced by indolebutyric acid (IBA). The experiment was conducted as follows: leaf explants obtained from a plant grown in vitro for 6 months were inoculated in a culture medium, Wood Plant Medium (WPM) supplemented with sucrose (2%), agar (0.7%) and 1.0 mg/L of (AIB) with 4 replications per treatment and maintained under a photoperiod of 16 hours of light and temperature of 25 C° and evaluated. Then the formed roots were transferred to an Erlenmeyer flask with liquid WPM medium in the presence and absence of IBA (1.0 mg/L), MJ (0.2 mg/L) and AS (0.1 mg/L). In addition to the control treatment, 14 treatments were used, 7 in the presence of AIB and 7 in the absence of AIB. At the end of 28 days, the fresh weight and length of the roots formed were evaluated. The best treatment was half WPM + MJ 0.1 mg/L. A second experiment with the objective of evaluating the effect of IBA and MJ on noni rhizogenesis was carried out. With the following treatments: 1) control (WPM medium devoid of AIB and MJ); 2) WPM with 1.0 mg/L IBA; 3) WPM with 0.1 mg/L MJ; 4) WPM with 1.0 mg/L of IBA and 0.1 mg/L of MJ. After 28 days, the biomass was used to carry out biochemical tests: quantification of hydrogen peroxide (H₂O₂), evaluation of the enzymes guaiacol peroxidase (POX), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) and evaluating the content of photosynthetic pigments. The highest quantification of total proteins was obtained in WPM medium with 0.1 mg/L of MJ and 1.0 mg/L of IBA, presenting 0.24 mgP/mL of total proteins. The POX, CAT and APX enzymes did not show significant differences. The concentration of hydrogen peroxide was highest in WPM medium containing 0.1 mg/L of MJ and 1.0 mg/L of IBA, with 1709.44 uM/gmf. For carotenoids, the best treatment was WPM medium supplemented with 0.1 mg/L of MJ in the presence of IBA, which resulted in a concentration of 8.62 ug/mL. Thus, it can be concluded that noni leaf explants subjected to the effect of IBA induce rhizogenesis, and that the roots subjected to the effect of IBA and the MJ elicitor are capable of increasing the biomass of *M. citrifolia* L.

Keywords: Noni; elicitor; *in vitro* cultivation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Aspectos botânicos de *Morinda citrifolia* L. (A) planta em campo, (B), (C) folha e fruto, respectivamente.11

FIGURA 2. Plantas de *M. citrifolia* L. propagadas a partir de segmento nodal cultivado por dois meses em meio WPM (*Wood Plant Medium*) suplementado com 1,0 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP).....19

FIGURA 3. Explantes foliares de noni (*Morinda citrifolia* L.) em meio WPM (*Wood Plant Medium*) suplementado com 2% de sacarose, 0,7% de ágar e 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB), na fase inicial (2 semanas) e fase final (4 semanas).....24

FIGURA 4- Raízes de noni (*Morinda citrifolia* L.) cultivadas por 28 dias em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido com metil jasmonato (MJ), ácido salicílico (AS) e ácido indol butírico (AIB) nas concentrações seguintes: Controle – ausência de reguladores e elicitores (A); 0,2 mg/L de MJ e 0,2 mg/L de AS (B); 0,2 mg/L de MJ (C); 0,2 mg/L de AS (D); 0,1 mg/L de MJ e 0,1 mg/L de AS (E); 0,1 mg/L de AS (F) e 0,1 mg/L de MJ (G) ambos na presença e ausência de (AIB) 1.0 mg/L.....24

FIGURA 5. Peso fresco de raízes de *M. citrifolia* L. após 28 dias em meio WPM (*Wood Plant Medium*) desprovido de elicitores (controle) ou suplementado com: 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L de ácido salicílico (AS); 0,2 mg/L de MJ; 0,2 mg/L de AS; 0,1 mg/L de MJ e 0,1 mg/L de AS; 0,2 mg/L de MJ e 0,2 mg/L de AS. Todos os tratamentos que foram testados na presença de 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB) correspondem às barras pretas e os tratamento que foram testados na ausência de (AIB) são representados com barras brancas.....26

FIGURA 6- Detalhe das raízes de *Morinda citrifolia* L. cultivadas por 28 dias em meio WPM (*Wood Plant Medium*) suplementado com 0,2 mg/L de metiljasmonato na presença e ausência de 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB).....27

FIGURA 7. Comprimento das raízes de *Morinda citrifolia* L. após 28 dias de cultivo em meio líquido WPM (*Wood Plant Medium*) desprovido de elicitores (controle) ou suplementado com: 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L de ácido salicílico (AS); 0,2 mg/L de MJ; 0,2 mg/L de AS; 0,1 mg/L de MJ e 0,1 mg/L de AS; 0,2 mg/L de MJ e 0,2 mg/L de AS. Todos os tratamentos que foram testados na presença de 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB) correspondem às barras pretas e os tratamentos que foram testados na ausência de (AIB) são representados com barras brancas.....28

FIGURA 8. Raízes de *Morinda citrifolia* L. na fase inicial do acúmulo de biomassa em meio nutritivo WPM (*Wood Plant Medium*) líquido. Foram testados os seguintes tratamentos: A) Controle (ausência de auxina e de elicitores); B) 1,0 mg/L de ácido indolbutírico (AIB); C) 0,1 mg/L de metil-jasmonato (MJ) e D) 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB.....29

FIGURA 9. Acúmulo de raízes de *Morinda citrifolia* L. após 28 dias de cultivo em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido na condição controle (ausência de elicitores e auxina) (A) controle, (B) 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB), (C) 0,1 mg/L de metil-jasmonato (MJ), (D) 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB.....29

FIGURA 10. Peso fresco das raízes de *Morinda citrifolia* L. para os tratamentos: (A) controle (ausência de regulador e elicitores); (B) 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ) e +1,0 mg/L de AIB.....30

FIGURA 11. Conteúdo de proteínas totais solúveis em raízes de *Morinda citrifolia* L. cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/l de ácido indolbutírico (AIB); 0,1 mg/L de metil-jasmonato (MJ); 0,1 mg/L MJ e 1,0 mg/L AIB; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.....30

FIGURA 12. Atividade da peroxidase de guaiacol (POX) em raízes de *Morinda citrifolia* L. cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L MJ e 1,0 mg/L AIB. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.....31

FIGURA 13. Atividade da catalase (CAT) em raízes de *Morinda citrifolia* L., cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L MJ e 1,0 mg/L de AIB. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.....32

FIGURA 14. Atividade da peroxidase de ascorbato (APX) em raízes de *Morinda citrifolia* L. cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metiljasmonato (MJ); 0,1 mg/L MJ e 1,0 mg/L de AIB. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.....32

FIGURA 15. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em raízes de *Morinda citrifolia* L. cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.....34

FIGURA 16. Quantificação de clorofila “a” e clorofila “b” em raízes de *Morinda citrifolia* L., cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metiljasmonato (MJ); 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.....36

FIGURA 17. Quantificação de clorofila total e carotenoides em raízes de *Morinda citrifolia* L., cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB	Ácido indol butírico
ANOVA	Análise de variância
AS	Ácido salicílico
BAP	6- benzilaminopurina
APX	Peroxidase de ascorbato
CAT	Catalase
CPSMV	Vírus do Mosaico severo do Caupi
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
JA	Ácido jasmônico
KI	Iodeto de potássio
MJ	Metil jasmonato
PEG	Polietilenoglicol
PH	Peroxido de hidrogênio
PSMF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
POX	Peroxidase de guaiacol
RPM	Rotações por minuto
USDA	<i>United States Department Agriculture</i>
WPM	<i>Wood Plant Medium</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Aspectos botânicos de <i>Morinda citrifolia</i> L.	10
1.2 Atividades biológicas do noni	11
1.2.1 Atividade antioxidante e anti-inflamatória	12
1.2.2 Atividade anticancerígena	13
1.2.3 Atividade antimicrobiana	144
1.3. Cultivo <i>in vitro</i> dos tecidos vegetais de <i>Morinda citrifolia</i> L.	14
1.4 Elicitores e suas aplicações.....	15
1.4.1 Ácido Jasmônico, Metil jasmonato e Ácido salicílico	16
2. OBJETIVOS	188
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	199
3.1 Fonte dos explantes de noni.....	199
3.2 Indução de rizogênese a partir de explantes foliares do noni	20
3.3 Experimento 1: Efeito do ácido indolbutírico e dos elicitores metil jasmonato e ácido salicílico no cultivo <i>in vitro</i> de raízes de noni	20
3.4 Experimento 2: Efeito do ácido indolbutírico e do metil jasmonato no cultivo <i>in vitro</i> de raízes de noni.....	21
3.5 Extração e quantificação de proteínas solúveis totais	21
3.6 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.....	22
3.7 Concentração de peróxido de hidrogênio e de pigmentos fotossintéticos.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	244
4.1 Fase de enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Morinda citrifolia</i>	244
4.2. Experimento 1: Efeito do ácido indolbutírico e dos elicitores metil jasmonato e ácido salicílico no cultivo <i>in vitro</i> de raízes de noni	25
4.3. Experimento 2: efeito do ácido indolbutírico e do metil jasmonato no cultivo <i>in vitro</i> de raízes de noni.....	28
4.4. Determinação de proteínas totais solúveis	300
4.5 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes (POX, CAT, APX).....	311
4.6 Quantificação do peróxido de hidrogênio	34
4.6.1 Determinação dos pigmentos fotossintéticos	355
5. CONCLUSÃO.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos botânicos de *Morinda citrifolia* L.

Conhecida popularmente como Noni, *Morinda citrifolia* L. é uma planta da família Rubiaceae nativa do sudeste da Ásia, que possui crescimento rápido e apresenta ampla distribuição (DAVIS *et al.*, 2009).

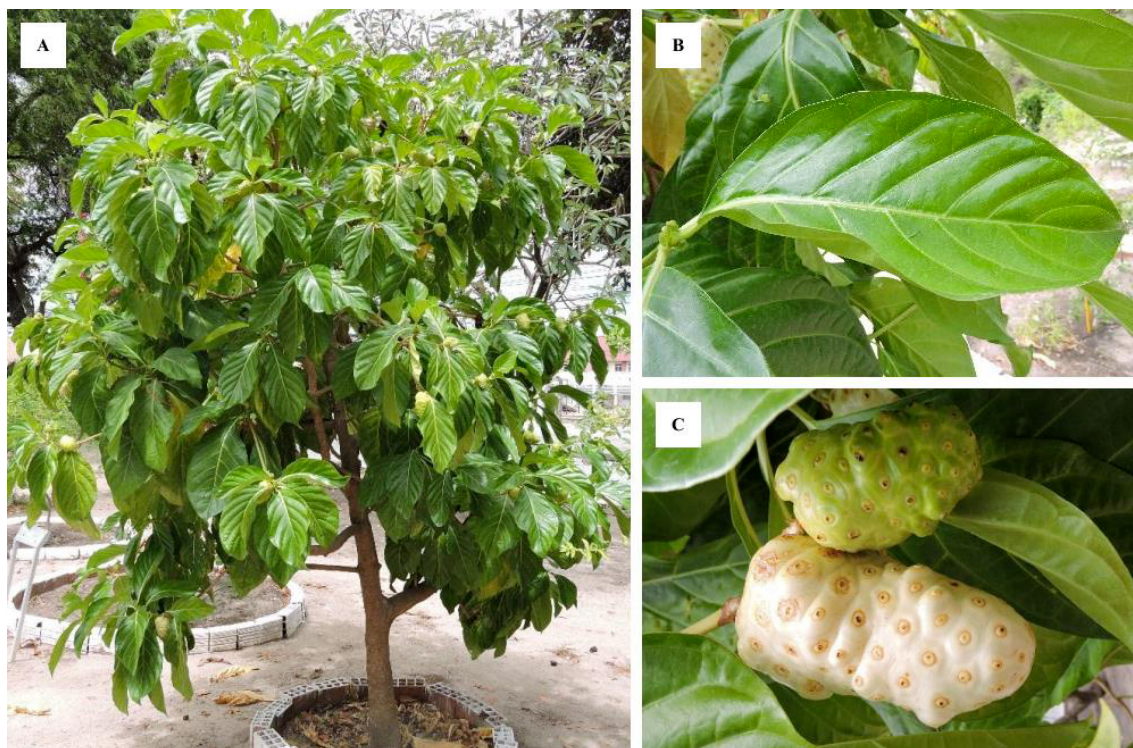
M. citrifolia L. possui porte arbustivo ou arbóreo, sendo uma espécie perene de clima tropical e subtropical, possuindo altura média de 3 a 10 metros (**FIGURA 1 A**). Segundo Correia *et al.* (2011), o cultivo do noni no Brasil é relatado nos estados do Acre, São Paulo, Minas Gerais, Pará, Sergipe, Ceará, dentre outros. A planta de noni possui filotaxia oposta dística, com folhas medindo 5 a 17 centímetros de comprimento e 10 a 40 centímetros de largura (**FIGURA 1 B**) e apresenta flores pequenas, tubulares e brancas, agrupadas e inseridas em pedúnculos (MORTON., 1992; ELKINS., 1998; DIXON *et al.*, 1999).

O fruto do noni apresenta 3-10 cm de comprimento e 3-6 cm de largura, com formato oval (**FIGURA 1 C**). Sua polpa é carnosa e succulenta, de sabor e aroma desagradáveis, devido ao ácido butírico exalado por esse órgão (VEIGA *et al.*, 2005). Sua cor é dependente do seu estágio de maturação, de forma que, à medida que o fruto avança para o estágio final, sua cor varia de verde, passando por amarelo e finalmente apresenta um tom branco (MCCLATHEY *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2002), sendo possível encontrar frutos em diferentes estágios de maturação na mesma planta ao mesmo tempo

Segundo Pawlus e Kinghorn (2007), existem pelo menos duas variedades de *M. citrifolia* reconhecidas, *M. citrifolia* var. *citrifolia* e *M. citrifolia* var. *bracteata*. Abou Assi e colaboradores (2017), acrescentam que as duas variedades de noni podem ser distinguidas pelo tamanho das folhas e odor dos frutos. No entanto, a maioria das publicações não faz essa distinção, de forma que na nomenclatura é observada apenas *M. citrifolia* L. As características botânicas diferem discretamente entre as variedades, de forma que um observador leigo não as distingue.

M. citrifolia L. apresenta potencial como fonte de produtos naturais, utilizando a tecnologia de cultivo *in vitro* e dessa forma, produzindo compostos medicinais específicos a uma taxa semelhante ou superior à planta cultivada em campo, porém com uma reprodutibilidade superior. Dados mostraram que culturas *in vitro* de raiz de *M. citrifolia* L. poderiam ser usadas para a produção comercial de produtos fitoquímicos, tais como flavonoides, compostos fenólicos e antraquinonas, a exemplo da rubiadina (BAQUE *et al.*, 2012).

FIGURA 1. Aspectos botânicos de *Morinda citrifolia* L. (A) planta em campo, (B), (C) folha e fruto, respectivamente.



FONTE: (SALES, 2016)

1.2 Atividades biológicas do noni

Existem diversas pesquisas relacionadas às atividades biológicas com *M. citrifolia* L., sejam através de ensaios *in vitro* ou *in vivo*, nas quais foram analisados extratos ou substâncias isoladas de diferentes partes da planta. Esses estudos têm revelado e

confirmado algumas das atividades biológicas da planta (PAWLUS e KINGHORN *et al.*, 2007). Entre as atividades biológicas de *M. citrifolia* L., descritas, pode-se citar: atividades antibacteriana, antiviral, anti-helmíntica, analgésica, hipotensora, modulação imunológica, antioxidante, hipoglicemiante, antidepressiva e anti-inflamatória (WANG e SU, 2001; WANG *et al.*, 2002; CHAN-BLANCO *et al.*, 2006).

Em estudos realizados por Anekpankul e colaboradores (2007) com raízes de noni foi relatado que as raízes da planta são ricas em compostos como antraquinonas, entre elas o damnacantal, um valioso composto anticâncer.

Além de metabólitos secundários o noni é uma fonte de proteínas com potencial farmacológico. Em estudos realizados por Campos e colaboradores (2016) foi relatada a purificação, a partir da semente de noni, da proteína transferidora de lipídios (McLTP1), que apresenta efeito anticonceptivo e potencial como uma fonte de novos medicamentos para alívio da dor. Esse é o primeiro relato do isolamento de uma proteína da espécie *M. citrifolia* L. associada às propriedades terapêuticas da planta.

1.2.1 Atividade antioxidante e anti-inflamatória

Dentre as atividades biológicas associadas ao noni destacam-se as atividades antioxidante e anti-inflamatória. Estudos realizados com o suco do fruto de *M. citrifolia* L., por exemplo, mostraram uma atividade antioxidante 2,8 e 1,4 vezes maior do que a vitamina C e o picnogenol, respectivamente. Em avaliação *in vitro*, extratos do fruto de noni obtidos com metanol, clorofórmio, etanol e butanol foram capazes de inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), devido ao fato do noni possuir fitoestrogênios do grupo dos linhanos, como americanol A, americanina A, ácido americanoico A, morindolina e isoprincepina (KAMIYA *et al.*, 2004).

Em estudos *in vitro*, a atividade anti-inflamatória foi detectada no suco do fruto de *M. citrifolia* L., por meio de determinação de sua atividade inibitória direta da ciclooxigenase (COX) 1 e 2 (DUSSOSSOY *et al.*, 2011). No estudo *in vivo*, utilizando também o suco do fruto, demonstrou-se uma redução do edema da pata induzido por carragenana em ratos, revelando um efeito anti-inflamatório forte comparável as de drogas

inflamatórias não-esteroidais, tais como ácido acetilsalicílico, indometacina e celecoxibe, sem efeitos secundários (SU *et al.*, 2001).

Quanto à sua ação anti-inflamatória foi relatado por Campos *et al.* (2017) que a proteína McLTP1 purificada das sementes de noni apresentou efeito sobre a inibição da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina. Além disso, observou-se ainda o aumento dos níveis de IL-10.

1.2.2 Atividade anticancerígena

Alguns componentes químicos de partes da planta *M. citrifolia* L. São principalmente relacionados com atividades anticancerígenas. Há relatos, por exemplo de que polissacáridos sulfatados desestabilizam a interação entre glicosaminoglicano e certas proteínas, resultando na interrupção da metástase (LIU *et al.*, 2001). O damnacantal, por sua vez, inibe a formação e crescimento de tumores por interferir na ativação dos genes RAS (*RAt Sarcoma vírus*) (HIRAMATSU *et al.*, 1993), ou através do aumento da apoptose em linhagens celulares de câncer de colo retal humano (NUALSANIT *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Wang e colaboradores (2019) relataram que extratos das raízes de *M. citrifolia* se mostraram eficientes quanto à citotoxicidade para células cancerosas do fígado, e relatam ainda que extratos de *M. citrifolia* L. podem promover a proliferação celular em células L02 (normais) e inibir a proliferação em HELPG2 e SMMCH771 (células cancerosas).

Em estudos realizados por Ruhomally e colaboradores (2016), utilizando o extrato metanólico dos frutos de noni, foi demonstrada a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato em modular o estresse oxidativo. Efeitos antiproliferativos do extrato metanólico dos frutos contra as células (SW872) do lipossarcoma humano foram observados.

1.2.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana relatada para extratos do fruto do noni pode estar ligada à alta concentração de iridóides, principalmente, ácido diacetil-asperuloídico e ácido asperulosídico (WEST *et al.*, 2012). Segundo ABOU ASSI e colaboradores (2017) as atividades antimicrobianas do extrato foliar da *M. citrifolia* contra *Salmonella* (S76), *Staphylococcus aureus* (B313) e *Mycobacterium phlei*, foram atribuídas à presença de compostos fenólicos, tais como acubina, L-asperulósido, alizarina e escopoletina.

As propriedades antifúngicas de extratos do fruto de *M. citrifolia* obtidos com solventes orgânicos foram testados em um ensaio *in vitro* contra diferentes espécies incluindo *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus* spp., *Aspergillus flavus* e *Mucor* spp. A inibição máxima contra *Trichophyton mentagrophytes* foi encontrada nas amostras extraídas com metanol e acetato de etila, resultando em 79,3% e 62,06% de inibição de crescimento do fungo, respectivamente, enquanto que a inibição de quase 50% foi observada para o extrato metanólico contra espécies de *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus*, e nenhum dos extratos mostraram-se ativos contra *Candida albicans* e *Aspergillus* spp (JAYARAMAN *et al.*, 2008).

1.3. Cultivo *in vitro* dos tecidos vegetais de *Morinda citrifolia* L.

A micropropagação é um método de propagação vegetativa amplamente estudado em diversas espécies vegetais para a multiplicação *in vitro* em larga escala de muitas plantas economicamente e medicinalmente valiosas (PATTNAIK e CHAND *et al.*, 1996). Os estudos realizados por Wei *et al.* (2006), Subramani *et al.* (2007) e Gajakosh *et al.* (2010) relataram o efeito de reguladores de crescimento na organogênese de ápices caulinares e explantes de folhas de noni. Outro estudo realizado por Sreeranjini e Siril (2014) resultou em uma metodologia promissora para a regeneração de plantas de noni a partir da multiplicação dos brotos de *M. citrifolia in vitro*.

Dentre as vantagens da utilização das técnicas de cultivo *in vitro*, estão: a possibilidade de se obter várias plantas a partir de um único explante inicial,

independentemente de condições climáticas, redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; melhores condições sanitárias e eliminação de doenças; reprodução do genótipo da planta-mãe, geralmente com fidelidade durante a multiplicação e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (ERIG *et al.*, 2005).

Mahipal e colaboradores (2015) propuseram um protocolo de cultura de tecidos baseado na multiplicação de segmentos nodais de uma planta de noni com quatro anos, obtendo ao final do processo cerca de 100% de sobrevivência das plantas em condições naturais, após aclimatação na estufa. Outra metodologia aplicada por Shekhawat e colaboradores (2015) utilizaram o enraizamento *ex vitro* das plantas de *Morinda coreia* multiplicadas *in vitro*, obtendo cerca de 28,6 raízes por planta, demonstrando, dessa maneira, a eficiência do processo.

Os avanços na pesquisa biotecnológica de plantas têm demonstrado que o cultivo *in vitro* de raízes adventícias é um método alternativo ao cultivo da planta em campo. A biomassa celular ou cultura de raiz para produção de compostos bioativos, a partir de raízes adventícias induzidas sob condições estéreis em meio suplementado com fitorregulador, demonstrou elevada taxa de proliferação, enormes potencialidades de aumento e produção estável de metabólitos secundários com importância terapêutica (HAHN *et al.*, 2003 e YU *et al.*, 2005).

Em estudos realizados por Lima (2017) foram identificados inibidores de proteases a partir de extratos com as folhas *in vitro* de *M. citrifolia* L, um registro inédito, pois esses compostos até então não haviam sido relatados para esta espécie em condições *in vitro*.

Kannan *et al.* (2021) relataram a eficácia dos reguladores de crescimento como ácido indolacético e ácido indol butírico para a produção de raízes adventícias, a partir de explantes foliares de noni, o que comprova estudos realizados anteriormente por Baque *et al.* (2010).

1.4 Elicitores e suas aplicações

Melhorias têm sido propostas para aumentar a produção de metabólitos secundários em culturas de raízes adventícias. Esse processo de otimização inclui as

condições de cultivo, a formulação nutritiva, o controle hormonal, o emprego de elicitores, além de outros parâmetros (RAHMAT; KANG, 2019).

Os compostos cuja biossíntese é influenciada por elicitores, em geral desempenham um importante papel na adaptação das plantas às pressões ambientais. A elicitação, mediada por fatores bióticos ou abióticos, é considerada a abordagem biotecnológica mais eficaz no sentido de promover o aumento de compostos bioativos. Entende-se como elicitores bióticos, moléculas de origem biológica, a exemplo de polissacarídeos derivados de paredes celulares de fungos e plantas. Já os elicitores abióticos incluem fatores hormonais, físicos e químicos.

Alguns elicitores abióticos tais como metil-jasmonato, ácido salicílico, sulfato de cobre, nitrato de prata, sorbitol, ácido cafeico, ácido oxálico, ácido fenil acético e etefon têm sido aplicados à cultura de raízes adventícias de plantas medicinais, com o objetivo de aumentar a biossíntese de metabólitos secundários. Dentre estes, metil jasmonato tem sido considerado, com base nos estudos, o elicitor mais eficaz, em se tratando de raízes adventícias (RHAMAT; KANG, 2019).

1.4.1 Ácido Jasmônico, Metil jasmonato e Ácido salicílico

O ácido jasmônico é um hormônio natural que controla a senescência da planta e induz proteinases em resposta a ferimento ou ataque de patógeno. Os jasmonatos são derivados do ácido linolênico, por um processo dependente de lipoxigenase. As lipoxigenases estão envolvidas na biossíntese de jasmonatos e, conseqüentemente, na resposta de defesa da planta ao patógeno ou aumento da capacidade de sintetizar outros compostos derivados de lipídeos, usados na defesa da planta (GUNDLACH *et al.*, 1992).

Rosa Jr *et al.* (2005) relataram que o ácido jasmônico e seu éster, o metil jasmonato, atuam como moléculas sinalizadoras que estão envolvidas diretamente no desenvolvimento das plantas e nas respostas aos estresses. Metil jasmonato é responsável por aumentar a expressão de genes que respondem a estresses, genes esses que participam da fotossíntese e da assimilação de carboidratos em plantas. Mais recentemente, tem sido estudado o papel do jasmonato (JA) nas rotas de sinalização relacionadas ao estresse (WASTERACK; HAUSE, 2013).

Estudos têm demonstrado que os estresses abióticos, incluindo a salinidade, induzem a síntese do jasmonato endógeno, o que leva a crer que esse regulador pode

desempenhar funções sinalizadoras ou estar envolvido nas respostas de senescência e redução do crescimento, a depender da concentração (KUROTANI *et al.*, 2015; SHAHZAD *et al.*, 2015; JIANG *et al.* 2015).

Alguns estudos apontam para o envolvimento do jasmonato no aumento da atividade de enzimas antioxidantes, o que poderia auxiliar na redução dos danos causados pelos mais variados estresses (JIANG *et al.*, 2015; SALIMI *et al.*, 2016).

Além disso, Ding *et al.* (2016) verificaram que a atividade da lipoxigenase 3 (LOX3), uma enzima envolvida na síntese de JA (ácido jasmônico) teve sua atividade induzida pelo estresse salino e que o mutante *lox3*, deficiente nessa enzima, apresentou hipersensibilidade à condição de salinidade. Isso evidenciou a associação entre o jasmonato e a tolerância à salinidade.

O ácido salicílico é um fitohormônio pertencente ao grupo bastante diversificado dos compostos fenólicos, sintetizado via fenilpropanóide, a partir da L-fenilalanina, que, por ação da fenilalanina amônio-liase (PAL), origina o ácido trans-18 cinâmico. A aplicação do ácido salicílico pode inibir a germinação e o crescimento da planta, interferir na absorção das raízes, reduzir a transpiração, causar a abscisão das folhas, alterar o transporte de íons, induzindo uma rápida despolarização das membranas, ocasionando um colapso no potencial eletroquímico (KERBAUY, 2008).

O ácido salicílico pode regular a via de formação dos flavonoides, sendo considerado por alguns autores como um fito hormônio envolvido nas reações de defesa da planta, induzindo a resposta sistêmica adquirida (CURTIS *et al.* 2004). Além de desencadear tais respostas, também está envolvido na ativação de genes relacionados a respostas de estresse à seca, ao frio, ao calor, à salinidade e a radiação UV (PENG; JIANG 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer condições experimentais para avaliar o efeito da combinação de ácido indolbutírico (AIB) e elicitores no acúmulo de biomassa de raízes adventícias de *Morinda citrifolia* L.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do ácido indolbutírico e dos elicitores ácido salicílico e metil jasmonato no cultivo *in vitro* de raízes de noni induzidas a partir de explantes foliares.
- Avaliar a atividade das enzimas peroxidase de guaiacol (POX), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) em amostras de raízes de noni cultivadas na presença de ácido indolbutírico e na presença ou ausência de metil jasmonato.
- Quantificar peróxido de hidrogênio e pigmentos fotossintéticos em amostras de raízes de noni cultivadas, na presença de ácido indolbutírico e na presença ou ausência de metil jasmonato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fonte dos explantes de noni

Plantas de noni foram mantidas *in vitro* por meio do subcultivo no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UFC, após os segmentos nodais serem submetidos à formulação nutritiva de Lloyd e McCown (1981), denominada de *Wood Plant Medium* (WPM), e suplementada com 1,0 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP), contendo 20 g/L de sacarose, 7 g/L de ágar e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121 °C, 15 minutos). Ciclos sucessivos de subcultivos foram realizados a cada dois meses. As plantas propagadas a partir dos segmentos nodais foram utilizadas como fonte de explantes foliares nos experimentos subsequentes (**FIGURA 2**).

FIGURA 2. Plantas de *M. citrifolia* L. propagadas a partir de segmento nodal cultivado por dois meses em meio WPM (*Wood Plant Medium*) suplementado com 1,0 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP).



Fonte: Autora

3.2 Indução de rizogênese a partir de explantes foliares do noni

As plantas de noni, mantidas *in vitro* em condições assépticas, com idade média de 6 meses, foram usadas como fonte de explantes foliares que foram inoculados em placas de Petri (90 mm) contendo 20 mL de meio WPM (LLOYD e McCOWN., 1981) suplementado com sacarose 2%, ágar 0,7%, e a auxina ácido indolbutírico (AIB) na concentração de 1 mg/L. Cada placa de Petri continha 5 explantes foliares de noni, totalizando ao final 20 placas e 100 explantes. As culturas foram mantidas por 35 dias na sala de cultivo do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, a 25 °C e fotoperíodo de 16 horas, observadas por um período de 35 dias e avaliadas posteriormente.

3.3 Experimento 1: Efeito do ácido indolbutírico e dos elicitores metil jasmonato e ácido salicílico no cultivo *in vitro* de raízes de noni

O material vegetal utilizado nesta fase foi proveniente da fase de enraizamento descrita no item 3.2. As raízes obtidas *in vitro*, passaram por higienização com água destilada estéril, para retirada de quaisquer resíduos. As raízes induzidas na primeira fase do experimento foram transferidas para Erlenmeyers contendo meio WPM líquido na presença e ausência da auxina ácido indol butírico (AIB) na concentração de 1,0 mg/L, nos seguintes tratamentos: 1) controle (meio WPM desprovido de reguladores de crescimento e elicitores); 2) 0,2 mg/L de metil jasmonato (MJ) e 0,2 mg/L de ácido salicílico (AS); 3) 0,2 mg/L de MJ; 4) 0,2 mg/L de AS; 5) 0,1 mg/L de MJ e 0,2 mg/L de AS; 6) 0,1 mg/L de MJ; 7) 0,1 mg/L de AS; 8) 1,0 mg/L de AIB; 9) 1,0 mg/L de AIB e 0,2 mg/L de MJ e 0,2 mg/L de AS; 10) 1,0 mg/L de AIB e 0,2 mg/L de MJ; 11) 1,0 mg/L de AIB e 0,2 mg/L de AS; 12) 1,0 mg/L de AIB e 0,1 mg/L de MJ e 0,1 mg/L de AS; 13) 1,0 mg/L de AIB e 0,1 mg/L de MJ; 14) 1,0 mg/L de AIB e 0,1 mg/L de AS.

3.4 Experimento 2: Efeito do ácido indolbutírico e do metil jasmonato no cultivo *in vitro* de raízes de noni

Com base nos resultados do primeiro experimento, um segundo experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito isolado ou combinado do AIB e MJ na rizogênese do noni. O experimento conduzido em delineamento inteiramente casualizado consistiu dos seguintes tratamentos: 1) controle (meio WPM líquido desprovido de AIB e MJ); 2) WPM líquido contendo 1,0 mg/L de AIB; 3) WPM líquido contendo 0,1 mg/L de MJ; 4) WPM líquido contendo 1,0 mg/L de AIB e 0,1 mg/L de MJ. A partir desse experimento foram coletadas amostras de raízes para quantificação de proteínas totais, determinação da atividade de enzimas antioxidantes (CAT, POX e APX) e quantificação de peróxido de hidrogênio e pigmentos fotossintéticos (clorofila A, B, totais e carotenoides). Os resultados foram determinados através de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey.

3.5 Extração e quantificação de proteínas solúveis totais

As raízes de noni oriundas do acúmulo de biomassa em meio líquido, para cada um dos tratamentos testados, foram maceradas no almofariz (100 mg) por 10 minutos, em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), contendo NaCl 0,15 M, PEG 3% (v/v), PMSF 1 mM, EDTA 2 mM e PVPP 1% (m/v), na proporção 1:4 (m/v). Após maceração, o homogeneizado foi centrifugado (13.000 x g, 4 °C, 20 min), o sobrenadante coletado e dialisado exaustivamente contra tampão de extração durante 24 horas, a 4 °C, com um volume do tampão correspondendo a 20 vezes o volume do extrato, sendo duas trocas do tampão feitas nesse período.

A quantificação de proteínas solúveis totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976). A uma alíquota de 0,1 mL do extrato de raiz de noni dialisado em tampão fosfato 100 mM pH 7, 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados. A mistura foi agitada em vórtex. Após repouso, leituras de absorbância foram feitas a 595 nm, em espectrofotômetro (Novaspec III da Pharmacia). Através de uma curva pré-estabelecida com valores de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), a quantidade de proteína solúvel na amostra foi

determinada. Os valores foram obtidos em triplicata e expressos em miligramas de proteína por mililitro (mgP/mL).

3.6 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da peroxidase de guaiacol foi determinada segundo a metodologia de Foyer e Noctor (1998). Inicialmente 0,5 mL do extrato de raiz de noni dialisado foi adicionado a 0,8 mL do tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,2), contendo 0,5 mL de guaiacol 20 mM e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio. A mistura foi deixada em banho maria a 30 °C por 10 minutos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 480 nm, em intervalos de 30 segundos até completar 2 minutos. A unidade de atividade (UA) foi estabelecida como variação da absorbância por minuto e expressa em unidade por miligrama de proteína (UA/mgP).

A metodologia da atividade de catalase (CAT) foi descrita por Havir e McHale (1987) e Peixoto *et al.* (1999). Em uma alíquota de 0,8 mL da solução tampão fosfato de potássio 75 mM (pH 7,0), 0,1 mL do extrato dialisado de raiz de noni foi adicionado, sendo essa mistura reacional deixada em banho-maria a 30 °C durante 10 minutos. Após esta etapa, 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 112,5 mM foi adicionado à mistura reacional e a atividade da enzima foi medida a 240 nm com base no decréscimo da absorbância em intervalos de 20 segundos até atingir 2 minutos. A unidade de atividade (UA) foi estabelecida como a variação da absorbância por minuto e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

A atividade de APX foi determinada seguindo a metodologia descrita por Koshiba (1993) e modificada por Peixoto *et al.* (1999). Inicialmente, 0,1 mL de extrato dialisado de raiz de noni foi adicionado a 0,8 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0) contendo ascorbato 0,5 mM, e essa mistura deixada em banho-maria a 30 °C por 10 minutos. A atividade de APX foi iniciada após a adição de H₂O₂ 2 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 290 nm, em intervalos de 30 segundos, até atingir 3 minutos. A unidade de atividade (UA) foi estabelecida como a variação da absorbância por minuto e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

3.7 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio e de pigmentos fotossintéticos

Para determinação do peróxido de hidrogênio seguiu-se a metodologia de Alexieva *et al.* (2001), com modificações. Um total de 200 mg de raízes de noni frescas passaram pelo processo de maceração no almofariz com 2 mL de TCA 5% durante quatro minutos. Em seguida o extrato foi colocado em microcubos de 2 mL e as amostras centrifugadas por 15 minutos, a 4 °C, 12000 x g. Após a centrifugação foram adicionados 500 uL da amostra de extrato de raiz de noni, 500 uL de tampão fosfato de potássio 10 mM e 1 mL de KI (1 M). Aguardou-se 15 minutos com as amostras em temperatura ambiente e escuro e em seguida foi realizada leitura em cubeta de quartzo a 390 nm.

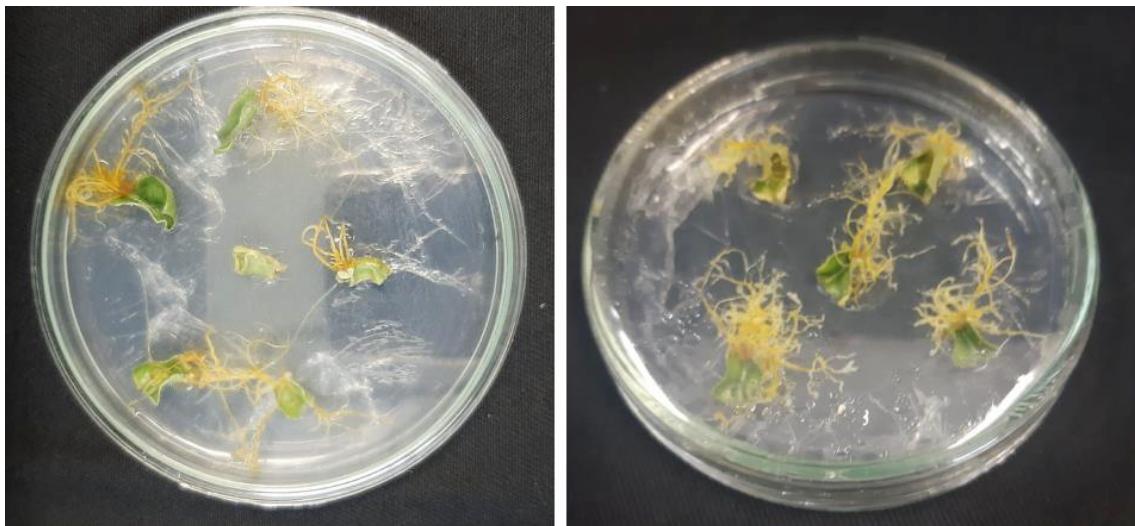
Para determinação das clorofilas totais seguiu-se a metodologia de Welburn (1994). Foram pesadas 50 mg de raiz de noni, após colocadas em tubos de ensaio com 2 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃). As amostras foram deixadas no escuro por 24 horas e após esse período passaram por centrifugação durante 10 minutos a 25 °C. Passado o intervalo foram realizadas leituras no espectrofotômetro a 480 nm, 649 nm e 665 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fase de enraizamento *in vitro* de *Morinda citrifolia*

A indução de raízes adventícias a partir dos explantes foliares de noni inoculados em meio WPM suplementado com 2% de sacarose, 0,7% de ágar e 1,0 mg/L de ácido indolbutírico (AIB), foi observada após 21 dias do início do experimento (**FIGURA 3**). O enraizamento sob condições *in vitro* depende de vários fatores e entre os principais fatores relacionados, encontram-se os níveis de auxina endógena, as condições inerentes ao genótipo, meio de cultura, presença de reguladores de crescimento, carboidratos, nutrição mineral, compostos fenólicos e as condições ambientais de crescimento das plantas *in vitro* (SOUZA e PEREIRA, 2007).

FIGURA 3. Explantes foliares de noni (*Morinda citrifolia* L.) em meio WPM (*Wood Plant Medium*) suplementado com 2% de sacarose, 0,7% de ágar e 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB), na fase inicial (2 semanas) e fase final (4 semanas).



Fonte: Autora

4.2. Experimento 1: Efeito do ácido indolbutírico e dos elicitores metil jasmonato e ácido salicílico no cultivo *in vitro* de raízes de noni

Nessa fase do experimento preliminar para acúmulo de biomassa, as raízes de noni foram avaliadas após 28 dias de cultivo em meio WPM líquido suplementado com ácido indolbutírico e/ou elicitores (ácido salicílico e metil jasmonato). Observou-se que o tratamento na presença de auxina e do elicitor metil jasmonato apresentou melhor resultado, obtendo um maior acúmulo de biomassa, nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/L de metil jasmonato e 1,0 mg/L de AIB (**FIGURA 4**).

Nesse experimento, os tratamentos que consistiram na aplicação de ácido salicílico na ausência de AIB, não apresentaram resultados satisfatórios quando testados na concentração de 0,1 mg/L. Na concentração de 0,2 mg/L de ácido salicílico, porém foi observado maior acúmulo de biomassa quando comparado ao controle.

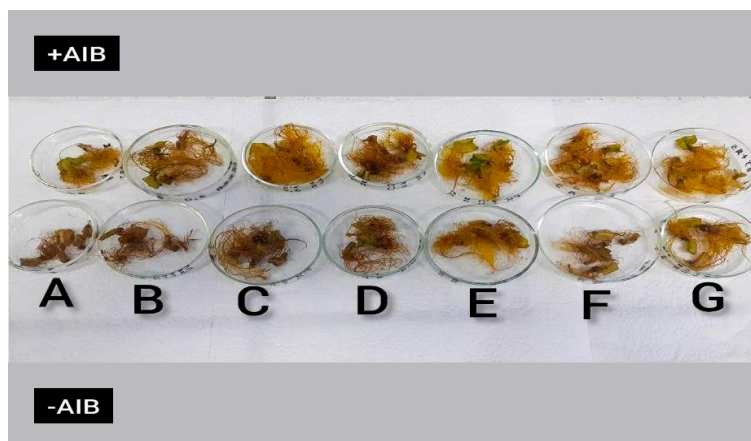
Quanto ao peso e comprimento das raízes de noni, houve destaque mais uma vez para os tratamentos com AIB e metil jasmonato, que apresentaram peso médio de raízes de 0,430 gramas e entre 3 e 4 centímetros de comprimento (**FIGURA 5**). Diante dos resultados obtidos a combinação de 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB foi a mais satisfatória e dessa forma foi escolhida para dar continuidade às etapas seguintes deste trabalho.

O termo elicitor é comumente empregado para qualquer agente físico ou químico capaz de induzir ou estimular a resposta de defesa em células/tecidos vegetais, através da produção de metabólitos secundários (RAMIREZ-ESTRADA *et al.* 2016; THAKUR e SOHAL, 2013).

No presente estudo com raízes de noni, a combinação do regulador de crescimento com o elicitor mostrou-se bastante eficaz, para obtenção do acúmulo de biomassa. Como já descrito em alguns estudos, na literatura, metil jasmonato é o melhor elicitor para acúmulo de biomassa, tratando-se de raízes (RAHMAT ; KANG, 2019).

Em estudos realizados por Giri *et al.* (2016) foi demonstrado que metil jasmonato também se mostrou eficiente em estimular a biossíntese de metabólitos secundários em culturas de células vegetais, por meio de muitos pontos de controle e por acionar a expressão de genes-chave que aumentam as atividades celulares em níveis bioquímicos e moleculares, através do envolvimento de compostos sinalizadores

FIGURA 4. Processo de enraizamento do noni (*Morinda citrifolia* L.) cultivadas por 28 dias em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido com metil jasmonato (MJ), ácido salicílico (AS) nas concentrações seguintes: Controle – ausência de reguladores e elicitores (A); 0,2 mg/L de MJ e 0,2 mg/L de AS (B); 0,2 mg/L de MJ (C); 0,2 mg/L de AS (D); 0,1 mg/L de MJ e 0,1 mg/L de AS (E); 0,1 mg/L de AS (F) e 0,1 mg/L de MJ (G) ambos na presença e ausência de 1 mg/L de ácido indol butírico 1.0 mg/L (AIB).



Fonte: Autora

FIGURA 5. Peso fresco de raízes de *M. citrifolia* L. após 28 dias em meio WPM (*Wood Plant Medium*) desprovido de elicitores (controle) ou suplementado com: 0,1 mg/L de metil_jasmonato (MJ); 0,1 mg/L de ácido salicílico (AS); 0,2 mg/L de MJ; 0,2 mg/L de AS; 0,1 mg/L de MJ e 0,1 mg/L de AS; 0,2 mg/L de MJ e 0,2 mg/L de AS. Todos os tratamentos que foram testados na presença de 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB) correspondem às barras pretas e os tratamento que foram testados na ausência de (AIB) são representados com barras brancas.

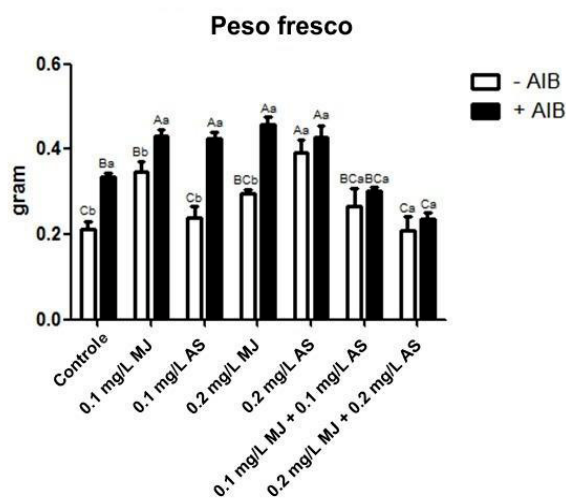
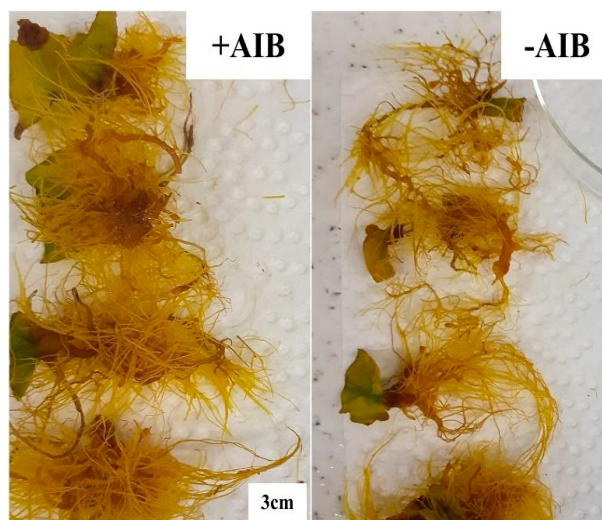


FIGURA 6. Detalhe das raízes de *Morinda citrifolia* L. cultivadas por 28 dias em meio WPM (*Wood Plant Medium*) suplementado com 0,2 mg/L de metil_jasmonato na presença e ausência de 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB).



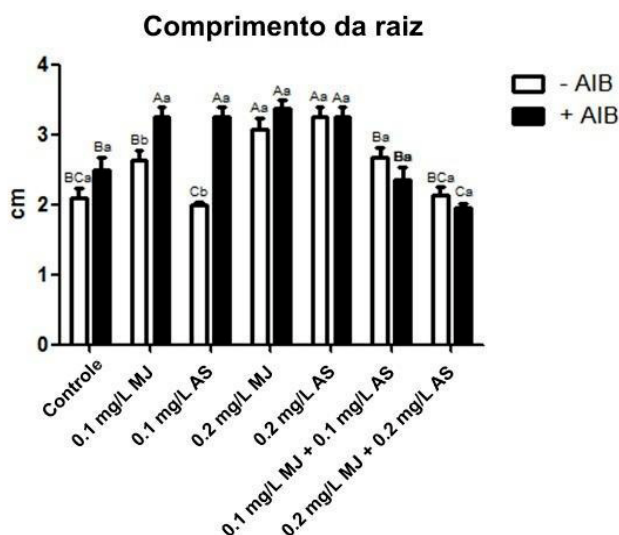
Fonte: Autora

O nível de metil jasmonato em plantas varia em função do tecido, do tipo de célula, da fase de desenvolvimento e da resposta a diversos estímulos ambientais (WEILER *et al.*, 1993). São encontrados por toda a planta, com as maiores concentrações sendo observadas em tecidos em crescimento, como hipocótilo, plúmula, ápice radicular, flores, frutos e folhas jovens (CREELMAN E MULLET, 1995).

Zhang *et al.* (2012) estudaram a influência do metil jasmonato sobre os níveis de transcrição de genes, atividade de enzimas e metabólitos relacionados ao catabolismo da arginina e injúrias por frio em tomate-cereja. O índice de injúrias por frio nos frutos tratados foi inferior em comparação aos não tratados. Os resultados indicam que o metil jasmonato está envolvido no catabolismo da arginina e ajuda a melhorar a tolerância de frutos de tomate-cereja às injúrias causadas pelo frio.

Nafie *et al.* (2011), estudando a ação do ácido jasmônico sobre mecanismos de resistência a estresse do melão sob a produção de metabólitos secundários, observaram que a aplicação de jasmonato resultou em plântulas de melão com maior resistência às condições de estresse, através da produção de moléculas bioativas específicas.

FIGURA 7- Comprimento das raízes de *Morinda citrifolia* L. após 28 dias de cultivo em meio líquido WPM (*Wood Plant Medium*) desprovido de elicitores (controle) ou suplementado com: 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L de ácido salicílico (AS); 0,2 mg/L de MJ; 0,2 mg/L de AS; 0,1 mg/L de MJ e 0,1 mg/L de AS; 0,2 mg/L de MJ e 0,2 mg/L de AS. Todos os tratamentos que foram testados na presença de 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB) correspondem às barras pretas e os tratamentos que foram testados na ausência de (AIB) são representados com barras brancas.



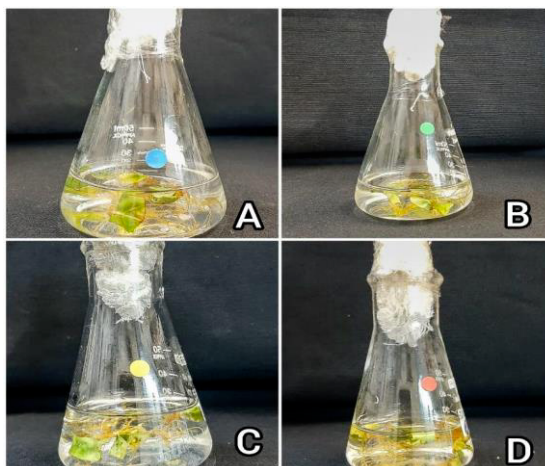
4.3. Experimento 2: efeito do ácido indolbutírico e do metil jasmonato no cultivo *in vitro* de raízes de noni

Após a realização do experimento preliminar onde foram testadas duas concentrações (0,1 e 0,2 mg/L) dos elicitores ácido salicílico e metil jasmonato, suplementados ao meio de cultura WPM, combinados ou isoladamente, na presença ou na ausência de ácido indolbutírico (1,0 mg/L), os resultados obtidos foram determinantes para planejamento do experimento seguinte. Este experimento consistiu nos seguintes tratamentos: A) controle (ausência de auxina e de elicitores); B) 1,0 mg/L de ácido indolbutírico (AIB) C) 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ) e D) 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB (**FIGURA 8**).

Ao final de 28 dias o tratamento que resultou no maior acúmulo de biomassa de raízes de noni foi a combinação entre a auxina ácido indolbutírico (1,0 mg/L) e o elicitor metil jasmonato (0,1 mg/L), como pode ser observado na FIGURA 9 e na FIGURA 10. A aplicação isolada da auxina e do elicitor resultou em diferença significativa em relação

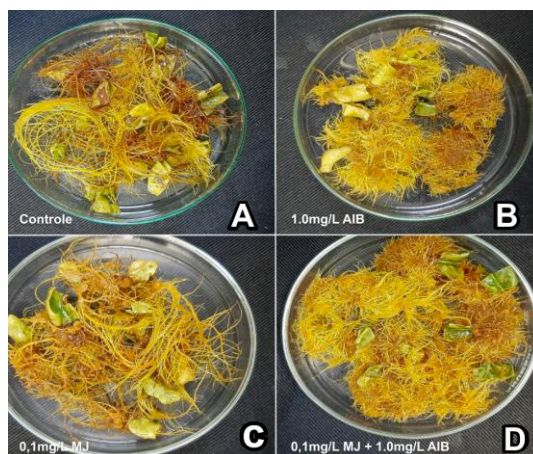
controle, mas o efeito combinado de AIB e MJ teve efeito positivo sobre o acúmulo de biomassa em raízes de noni.

FIGURA 8. Raízes de *Morinda citrifolia* L. na fase inicial do acúmulo de biomassa em meio nutritivo WPM (*Wood Plant Medium*) líquido. Foram testados os seguintes tratamentos: A) Controle (ausência de auxina e de elicitores); B) 1,0 mg/L de ácido indolbutírico (AIB); C) 0,1 mg/L de metil-jasmonato (MJ) e D) 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB.



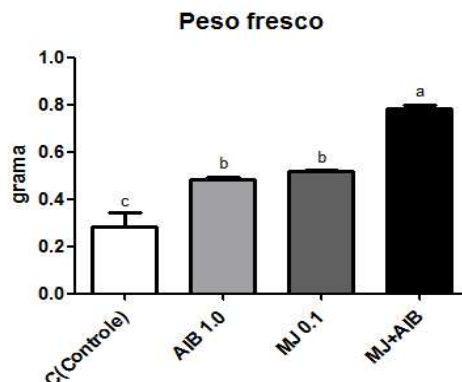
Fonte: Autora

FIGURA 9- Acúmulo de raízes de *Morinda citrifolia* L. após 28 dias de cultivo em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido na condição controle (ausência de elicitores e auxina) (A) controle, (B) 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB), (C) 0,1 mg/L de metil-jasmonato (MJ), (D) 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB.



Fonte: Autora

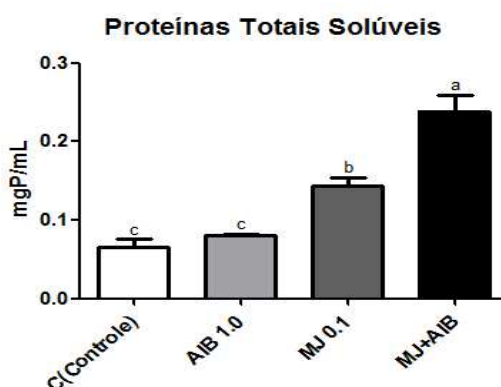
FIGURA 10. Peso fresco das raízes de *Morinda citrifolia* L. para os tratamentos: (A) controle (ausência de regulador e elicitores); (B) 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ) e 1,0 mg/L de AIB.



4.4. Determinação de proteínas totais solúveis

Na avaliação dos extratos de *M. citrifolia* L. para determinação das proteínas totais, o tratamento que se mostrou mais eficiente quanto ao conteúdo proteico foi 0,1mg/L MJ e 1,0 mg/L AIB, tendo apresentado 0,24 mgP/mL, uma quantidade 3,5 vezes maior que o tratamento controle (**FIGURA 11**).

FIGURA 11. Conteúdo de proteínas totais solúveis em raízes de *Morinda citrifolia* L. cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/l de ácido indolbutírico (AIB); 0,1 mg/L de metil-jasmonato (MJ); 0,1 mg/L MJ e 1,0 mg/L AIB; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.

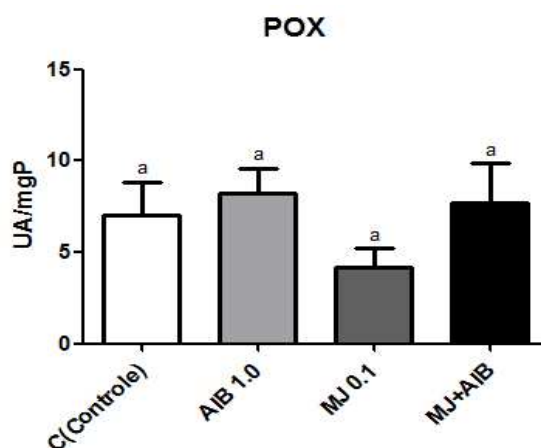


4.5 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes (POX, CAT, APX)

Raízes de noni cultivadas na condição controle ou na presença do elicitor MJ e da auxina AIB, em combinação ou isoladamente foram avaliadas em relação à atividade das enzimas antioxidantes POX, CAT e APX.

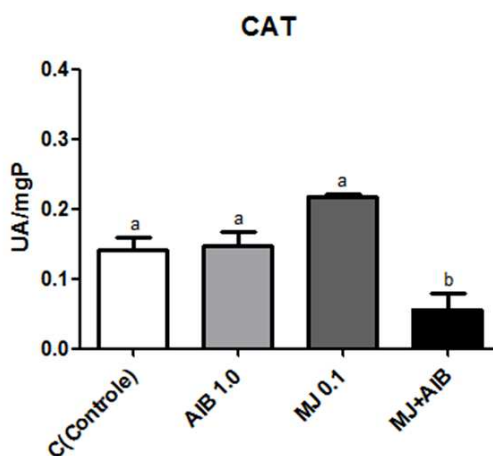
Para atividade da peroxidase de guaiacol (POX) não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (**FIGURA 12**).

FIGURA 12. Atividade da peroxidase de guaiacol (POX) em raízes de *Morinda citrifolia* L. cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L MJ e 1,0 mg/L AIB. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.



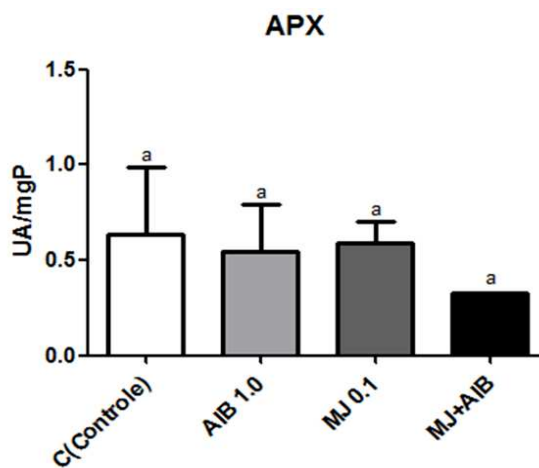
Para a atividade de catalase (CAT) foi observada uma significativa redução da atividade desta enzima quando as raízes de noni foram cultivadas na presença tanto do elicitor (0,1 mg/L de MJ) como da auxina (1,0 mg/L de AIB), como demonstrado na **FIGURA 13**. Nos demais tratamentos não foi observada diferença significativa na atividade da catalase.

FIGURA 13. Atividade da catalase (CAT) em raízes de *Morinda citrifolia* L., cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L MJ e 1,0 mg/L de AIB. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.



Para atividade de APX, a exemplo do que foi observado para POX não foi observada diferença significativa entre as médias dos tratamentos (**FIGURA 14**).

FIGURA 14. Atividade da peroxidase de ascorbato (APX) em raízes de *Morinda citrifolia* L. cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metiljasmonato (MJ); 0,1 mg/L MJ e 1,0 mg/L de AIB. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as médias dos tratamentos.



A atividade alterada de enzimas e teores anormais de compostos fenólicos podem ser usados como marcadores correlacionados à situação de estresse oxidativo. Uma das estratégias que a célula usa para lidar com a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e o estresse oxidativo é agir diretamente sobre as EROS através de compostos antioxidantes. É nesse momento que as enzimas antioxidantes, mesmo presentes em baixas concentrações, poderiam atrasar ou inibir as taxas de oxidação (ROCHA *et al.*, 2007).

As peroxidases estão presentes em todos os compartimentos celulares e catalisam a transferência de elétrons ao H_2O_2 usando diferentes substratos reduzidos como doadores (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985). As POX de plantas aumentam em resposta a vários estresses bióticos e abióticos, participando no catabolismo de auxinas e em processos de síntese de parede celular como a oxidação de fenóis, suberização e lignificação em plantas hospedeiras durante a reação de defesa contra patógenos (SYROS *et al.*, 2004).

Segundo Maia *et al.* (2012) as POX são enzimas capazes de reduzir os fenóis presentes em quaisquer partes da planta, utilizando seu ciclo catalítico, podendo ainda produzir OH^- a partir do peróxido de hidrogênio e dessa maneira viabilizar o alongamento celular.

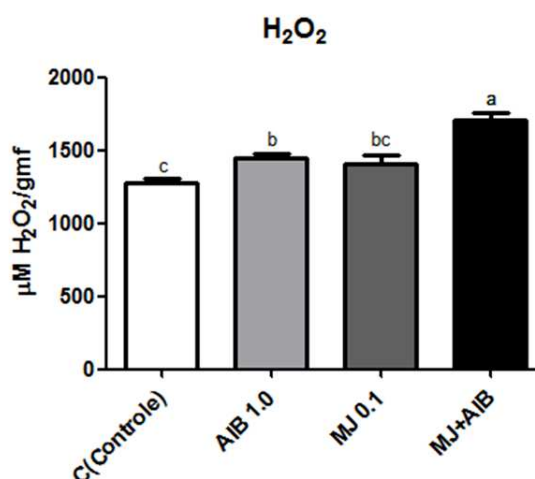
A Catalase (CAT) é uma enzima que tem por função catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). A inibição da CAT leva a um aumento das espécies reativas de oxigênio, levando o organismo a um estado de estresse oxidativo (SILVA *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos através desse trabalho diferem dos obtidos por Maia *et al.* (2012) utilizando raízes de feijão caupi, em que foi observada a inibição do crescimento radicular, sendo esses resultados atribuídos ao estresse salino e ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes, POX, CAT e APX. No resultado obtido nesse trabalho a atividade das enzimas antioxidantes CAT e APX não apresentaram diferença significativa, mantendo dessa maneira o H_2O_2 ativo, não sendo capaz de removê-lo.

4.6 Quantificação do peróxido de hidrogênio

Para a determinação do peróxido de hidrogênio os tratamentos apresentaram um aumento significativo, com destaque para o tratamento 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB (**FIGURA 15**) o que significa dizer que o H₂O₂ se manteve presente nas raízes de noni e sofreu pouca degradação.

FIGURA 15. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em raízes de *Morinda citrifolia* L. cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.



O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pode ser encontrado nos tecidos vegetais e por ser uma espécie reativa de oxigênio de pequeno porte e devido suas propriedades eletroquímicas pode se movimentar com facilidade através das membranas para outros compartimentos celulares por meio das aquaporinas, atuando como molécula sinalizadora do estresse e, em função dessas características, pode atuar como facilitador de diversos processos vegetais como a fotossíntese, atividade estomática, sistema antioxidante e aclimação por estresse SILVA *et al.*, 2019).

Em condições ambientais normais o H₂O₂ produzido nos diferentes órgãos vegetais auxilia em diversos processos fisiológicos, durante os estádios de

desenvolvimento das plantas, como ativação de enzimas chave durante a germinação de sementes; aceleração do crescimento de raízes primárias e laterais (ISHIBASHI *et al.* 2017; KHEDIA; AGARWAL e AGARWAL 2019)

O aumento do teor de H₂O₂, relatado no presente estudo, pode estar relacionado à baixa atividade de CAT e APX, já que essas enzimas são responsáveis pela remoção do peróxido de hidrogênio em qualquer parte da planta, principalmente se tratando de raízes. Uma vez que tenha havido a formação das espécies reativas de oxigênio, elas podem atuar nos tecidos vegetais causando danos, tantos fisiológicos como bioquímicos.

Bezerra (2016) relatou o aumento de H₂O₂ em folhas de feijão de corda infectados pelo vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV). Alguns resultados similares aos encontrados neste estudo foram observados por Spoustová *et al.* (2015). Em plantas de tabaco infectadas com o vírus Y da batata (PVY) também ocorreu o acúmulo de H₂O₂ nas plantas de tabaco transgênicas e consequente diminuição de sintomas provocados pela infecção do PVY, resultando na diminuição da suscetibilidade da planta a essa infecção.

4.6.1 Determinação dos pigmentos fotossintéticos

Com relação aos pigmentos fotossintéticos o presente estudo mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos testados para as concentrações de clorofila “a” e clorofila “b” (FIGURA 16). Para clorofilas totais, no entanto, houve um aumento na presença de MJ, quando comparado ao controle (FIGURA 17 A). Para carotenoides a concentração foi maior quando as raízes de noni foram cultivadas na presença da auxina AIB (1,0 mg/L) e do elicitor MJ (0,1 mg/L), em relação ao controle.

FIGURA 16. Quantificação de clorofila “a” e clorofila “b” em raízes de *Morinda citrifolia* L., cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.

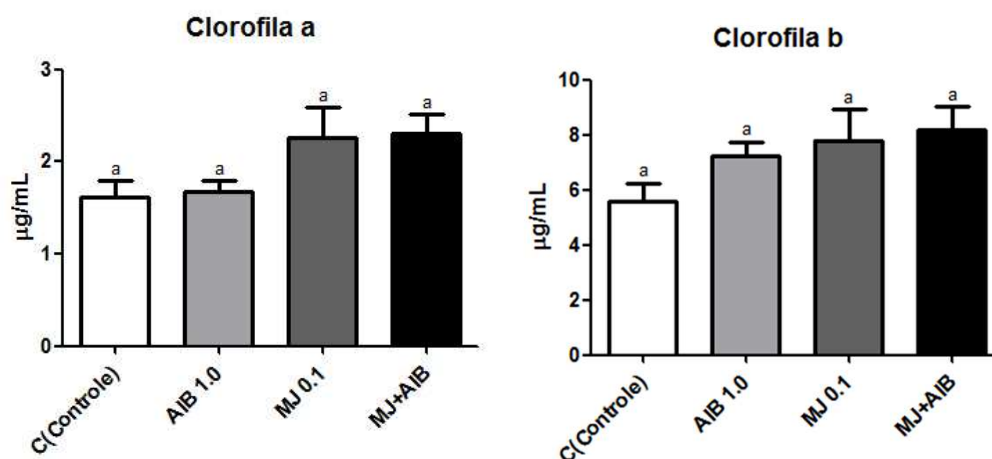
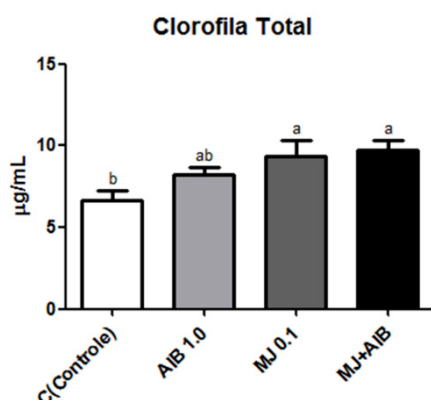
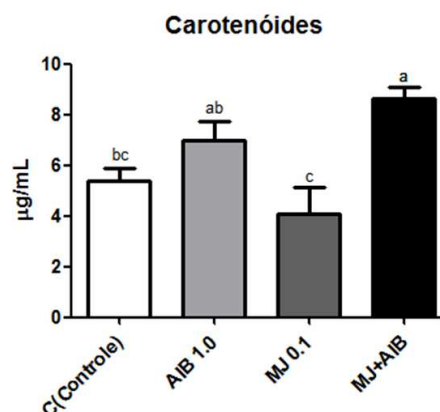


FIGURA 17 - Quantificação de clorofila total e carotenoides em raízes de *Morinda citrifolia* L., cultivadas em meio WPM (*Wood Plant Medium*) líquido desprovido de auxina e elicitor (controle) ou suplementado com: 1,0 mg/L de ácido indol butírico (AIB); 0,1 mg/L de metil jasmonato (MJ); 0,1 mg/L de MJ e 1,0 mg/L de AIB; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos tratamentos.

A.



B.



Trabalhos realizados por Souza *et al.* (2011) mostraram que os pigmentos fotossintéticos podem ser assimilados de diferentes maneiras e que a forma de cultivo das plantas, incluindo a fase de aclimação fazem toda a diferença na assimilação dessas

substâncias. Os autores demonstram ainda que plantas com exposição direta ao sol apresentaram menor taxa de assimilação de clorofilas totais e do tipo “a” e “b”. Já plantas sombreadas apresentaram aumento na produção de clorofilas totais e de clorofilas “a” e “b”, ou seja, a assimilação dos pigmentos fotossintéticos está totalmente relacionada com a radiação. A luz influencia a biossíntese de clorofila e outros pigmentos através da regulação da expressão de determinados genes (TSNOYAMA *et al.*, 2001).

García-Plazaola *et al.* (1999), em trabalhos com *Quercus ilex*, observaram aumentos consideráveis nos teores de carotenoides e antioxidantes (ascorbato, glutatona e α -tocoferol) em folhas a pleno sol em relação às folhas de sombra, e atribuíram esse fenômeno à capacidade de resistência à foto-oxidação por excesso de luz. Os baixos teores de pigmentos fotossintéticos (carotenoides e clorofila total), observados nas plantas cultivadas a pleno sol podem indicar a ocorrência da fotoinibição nestas plantas, devido à radiação, no que se refere à captação de luz em ambientes de menor luminosidade e à proteção contra a foto destruição em ambiente de maior luminosidade (GOMES, 2008).

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que os explantes foliares de noni quando submetidos ao efeito do ácido indolbutírico (AIB) induzem a rizogênese. Observou-se ainda que o ácido indolbutírico (AIB), combinado ao elicitor metil jasmonato, induz o aumento de a biomassa em raízes de *M. citrifolia* L. O efeito do ácido salicílico foi menos pronunciado do que o de metil-jasmonato em induzir o acúmulo de biomassa em raízes de noni.

Pode-se concluir ainda que as peroxidase POX e APX não tiveram sua atividade alterada pela presença da auxina AIB e do elicitor MJ no meio de cultivo de raízes de noni, mas a catalase sofreu uma expressiva redução de sua atividade quando as raízes de noni foram cultivadas na presença tanto do elicitor MJ como da auxina AIB. Essa condição experimental também resultou na maior concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de carotenoides. A concentração de clorofila total também foi alterada quando as raízes de noni foram cultivadas na presença do elicitor metil jasmonato.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU ASSI R. , DARWIS Y., ABDULBAQ I. M., KHAN A. A., VUANGHAO L., LAGHARI M.H. *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its-industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 5, p. 691-707 2017.

ANEKPANKUL T, GOTO M, SASAKI M, PAVASANT P, SHOTIPRUK A Extraction of anti-cancer damnacanthal from roots of *Morinda citrifolia* L. by subcritical water. **Sep Purif Technol** 55(3):343–349, 2007.

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

BAQUE M. A., MOH S., LEE E., ZHONG J., PAEK K. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor **Biotechnol. Adv.**, 30 (6) (2012), pp. 1255–1267.

BEZERRA E.A. **Respostas bioquímicas comparativas de genótipos suscetíveis e resistentes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] Desafiados com o vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV)**. Fortaleza, 2016. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará

CAMPOS D. C. O., COSTA A.S., LIMA A.D.R., SILVA F.D.A., LOBO M.D.P., MONTEIRO A.C.O., MOREIRA R.A., LEAL L.K.A.M., MIRON D., VASCONCELOS I.M., OLIVEIRA H.D. First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. **Int J Biol Macromol**. 86:71 – 92, 2016.

CHAN-BLANCO Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A. M.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M.; BRAT, P The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2006, p. 645 – 654.

CORREIA, A. A. S.; GONZAGA, M. L. C.; AQUINO, A. C.; SOUZA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição**, v. 22 (4), p. 609-615, 2011.

CURTIS, H.; NOLL, U.; STORMANN, J.; SLUSARENKO, A.J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.65, n.2, p.79-89, 2004.

DAVIS, T.D., AISSIG B.E.H, SANKHLA N. **Adventitious root formation in cuttings. Advances in plant sciences series**. vol. 2. Dioscorides press, Portland, Ore, p. 315, 1988.

DING, H.; LAI, J.; WU, Q.; ZHANG, S.; CHEN, L.; DAI, Y.; WANG, C.; DU, J.; XIAO, S.; YANG, C. Jasmonate complements the function of *Arabidopsis* lipoxygenase3 in salinity stress response. **Plant Science**, V.244, n.1, p. 1–7, 2016.

DIXON, A. R.; MCMILLEN, H.; ETKIN, N. L. Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). **J. Econ. Botany**, New York, v. 53, n. 1, p. 51- 68, jan. 1999.

DUSSOSSOY E., BRAT P., BONY E., BOUDARD F., POUCHEREP.T, MERTZ C., GIAIMIS J., MICHEL A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **J. Ethnopharmacol.**, 133 (1) pp. 108–115, 2011.

ELKINS, R. **Hawaiian Noni (*Morinda citrifolia*) Prize Herb of Hawaii and the South Pacific**. Woodland Publishing, Utah. 1998.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação foto autotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, 2005.

GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; ARTETXE, U.; BECERRIL, J. M. 1999. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L.) during winter. **Plant Science**, 143(2): 125-133

GIRI, C.C. ; ZAHEER, M. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, culturas de tecidos e órgãos: tendências recentes e uma avaliação da visão do céu. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** , 126,1-18, 2016.

GOMES, I. A. C.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; ALVES, J. D.; ALVARENGA, M. I. N.; ALVES, E.; BARBOSA, J. P. R. A. D.; FRIES, D. D. Alterações 1852 Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1843-1854, 2011 Souza, G. S. et al. morfofisiológicas em folhas de *Coffea arabica* L. cv. Oeiras sob influência do sombreamento por *Acacia mangium* Willd. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 38, n. 1, p. 109-115, 2008.

GUNDLACH, H., MULLER, M. J., KUTCHAN, T. M. ZENK, M.H.. Jasmonic acid in a signal transducer in elicitor induced plant cell cultures. **Plant Biology**, 89: 2389-2393, 1992

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J. M. C. Free **Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Clarendon Press: Oxford, 2006.

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol.** Jun;84(2):450–455, 1987.

HIRAMATSU T., IMOTO M., KOYANO T., UMEZAWA K. Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia* **Cancer Lett.**, 30 (2–3) pp. 161–166, 1993.

JAYARAMAN S. K., MANOHARAN M. S., ILLANCHEZIAN S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **Int. J. Integr. Biol.**, 3 (1), p. 44, 2008.

KAMIYA K., TANAKA Y., ENDANG H., UMAR M., SATAKE T. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. **J. Agric. Food Chem.**, 52 (19), pp. 5843–5848, 2004.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Guanabara: Koogan, 2008. 452 p.

KHEDIA, J., AGARWAL, P., ; AGARWAL, P. K. Deciphering hydrogen peroxide-induced signalling towards stress tolerance in plants. **Biotech**, 9(11), 1-13, 2019.

LIMA. A.M. **Bioprospeção de proteínas de interesse biotecnológico em folhas de *Morinda citrifolia* L.** Fortaleza, 2017. (Monografia apresentada ao curso de Biotecnologia), Universidade Federal do Ceará.

LLOYD, G. ; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, 61 *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v.30, p.421-327, 1981.

KANNAN, N. MONOKARI, M. MAHIPHAL, S. SHKHAWAT, M. S.. Enhanced production of anthraquinones and phenolic compounds using chitosan from the

adventitious roots of *Morinda coreia* Buck. and Ham. **Industrial Crops and Products**, 148, 112321, 2020.

KUROTANI, K.; HAYASHI, K.; HATANAKA, S.; TODA, Y.; OGAWA, D.; ICHIKAWA, H.; ISHIMARU, Y.; TASHITA, R.; SUZUKI, T.; UEDA, M.; HATTORI, T.; TAKEDA, S. Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. **Plant and Cell Physiology**, V.56, n.4, p. 779-789, 2015.

MAIA, J. M.; SILVA, S. L. F.; VOIGT, E. L.; MACÊDO, C. E. C. de; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica, Bahia**, n.26, v.2, p.342-349, 2012.

MAHIPAL S., SHEKHAWAT N., KANNAN M., MANOKARI C.P. Enhanced micropropagation protocol of *Morinda citrifolia* L. through nodal explants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, Volume 2, Issue 4, Pages 174-181, 2015.

MORTON, J. F., The ocean-going Noni, or Indian mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its “colourful” relatives. **Ecological Botany** 46, 241–256. 1992.

NAFIE, E.; Hathout, T. e Mokadem, A.S.A. - Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in Cucumis melo L. cells. **Brazilian Journal Plant Physiology**, vol. 23, n. 2, p. 161-174, 2011.

NELSON, S.C. **Noni seeds handling and seedling production**. Fruits and nuts. Cooperative extension service/CTAHR, University of Hawaii at Mānoa. Documento da internet: <http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/downloads/FN10.pdf>. (Acessado em: 19/09/2016), 2005.

Nualsanit T, Rojanapanthu P, Gritsanapan W, Lee SH, Lawson D, Baek SJ. Damnacanthal, a noni component, exhibits antitumorigenic activity in human colorectal cancer cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 2012; 23(8):915–923. ISSN: 0955-2863.

PATTNAIK S.K., CHAND P.K. *In vitro* propagation of the medicinal herbs *Ocimum americanum* L. syn. *O. canum* Sims (hoary basil) and *Ocimum sanctum* (holy basil). **Plant Cell Reports**, 15, pp. 846–850, 1996.

PAWLUS A. D., KINGHORN A. D. Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). **J. Pharm. Pharmacol.**, 59 (12), pp. 1587–1609, 2007.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; OREIRA, M. A Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.137-143, 1999.

PENG, L.; JIANG, Y. Exogenous salicylic acid inhibits browning of fresh-cut Chinese water chestnut. **Food Chemistry**, v.94, n.4, p.535-540, 2006.

RAHMAT, E.; KANG, Y. Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. **J. Plant Biotechnol** 46:143-157, 2019.

ROCHA, M.M.; LIMA, J.A.A.; FREIRE FILHO, F.R.; ROSAL, C.J.S.; LOPES, A.C.A. Resistência de genótipos de Caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) de tegumento branco a isolados de vírus das famílias Bromoviridae, Comoviridae e Potyviridae. **Ciência Rural**, v.8, p.85-92, 2003.

ROSA JR., V.E., NOGUEIRA, F.T.S.; MENOSSE, M.; ULIAN E.C.; ARRUDA, P. Identification of methyl jasmonate-responsive genes in sugarcane using cDNA arrays. **Brazilian Journal Plant Physiology** 17: 173-180., 2005,

RUHOMALLY, Z., SOMANAH, J., BAHORUN, T., NEERGHEEN-BHUJUN, V. S. *Morinda citrifolia* L. fruit extracts modulates H₂O₂-induced oxidative stress in human liposarcoma SW872 cells. **Journal of traditional and complementary medicine**, 6(3), 299-304., 2016.

SALIMI, F.; SHEKARI, F.; HAMZEI, J. Methyl jasmonate improves salinity resistance in German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) by increasing activity of antioxidant enzymes. **Acta Physiologiae Plantarum**, V.38, n.1, p. 1–14, 2016.

SILVA, P. C. C., DE AZEVEDO NETO, A. D., GHEYI, H. R., RIBAS, R. F., COVA, A. M. W., DOS REIS SILVA, C. R. Avaliação de métodos de aplicação de H₂O₂ para aclimação de plantas de girassol à salinidade. **Water Resources and Irrigation Management-WRIM**, 8(1-3), 1-4, 2019.

T. Syros T. Yupsanis A. Economou (2001) Factors affecting the determination of peroxidase activity of *Ebenus cretica* L. cuttings. **A preliminary survey J. Prop. Ornam. Plants** 1 50–53.

Ramirez-Estrada, K.; Vidal-Limon, H.; Hidalgo, D.; Moyano, E.; Golenioswki, M.; Cusidó, R.M.; Palazon, J. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* 2016, 21, 182.

SALES, M. S. **Cultivo in vitro de morinda citrifolia L. Visando a obtenção de moléculas de atividade antifúngicas**. Fortaleza, 2016. Monografia curso de (bacharelado em biotecnologia), Universidade Federal do Ceará.

SHEKHAWAT M.S., KANNAN N., MANOKARI M. *In vitro* propagation of traditional medicinal and dye yielding plant *Morinda coreia* Buch. Ham. **South African Journal of Botany**, Volume 100, Pages 43-50, 2015.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SOUZA, J.D.; SILVA, M. B.R.; ARGOLO, A. C.C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T.S.; PAIVA, P. M.G.; SILVA, M. D.C.; COELHO, L.C.B.B. A new Bauhinia monandra galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 696 -702, 2011.

SREERANJINI S., SIRIL E. A. Field performance and genetic fidelity evaluation of micropropagated *Morinda citrifolia* L. **Indian Journal of Biotechnology**, 13), pp. 121–130, 2014.

SU C., WANG M.Y., NOWICKI D., JENSEN J., ANDERSON G. **Selective cox-2 inhibition of *Morinda citrifolia* (Noni) *in vitro***. In: The Proceedings of the Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer. Inflammation and Related Disease. The 7th Annual Conference, Loews Vanderbilt Plaza, Nashville, Tennessee, USA. 2001.

SUBRAMANI J., ANTONY S., SELVARAJ D., VIJAY M., SAKTHIVEL M. Micropropagation of *Morinda citrifolia* L **International Journal of Noni Research**, 2, pp. 38 – 44, 2007.

VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; HIROCE, R.; MENDAÇOLLI, S. J.; TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. A. Noni: frutífera medicinal em introdução e aclimação no Brasil. **O Agrônômico**, v. 57, p. 20-21, 2005

WANG, M.Y.; SU, C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Annals New York Academy of Sciences**, v. 952, p.161-168, 2001.

WANG M.Y., WEST B.J., JENSEN C.J., NOWICKI D., SU C., PALU A.K., ANDERSON G. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research *Acta Pharmacol. Sin.* 23 (12) (2002), pp. 1127–1141

WANG M.; WANG Q.; YAN X.; FENG S. Comparison of Anthraquinones, Iridoid Glycosides and Triterpenoids in *Morinda officinalis* and *Morinda citrifolia* Using UPLC/Q-TOF-MS and Multivariate Statistical Analysis. **Molecules** p. 11- 16, 2019.

WEI L.J., LU P., SU W.P. Tissue culture and rapid propagation of *Morinda citrifolia* L. **Plant Physiology Communications**, 42, p. 475, 2006.

Weiler, E.W.; Kutchan, T.M.; Gorga, T.; Brodschelm, W.; Niesel, U. e Bublitz, F. (1993) - Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendrill coiling response of *Bryonia doica*. *Phytochemistry*, vol. 32, n. 3, p. 591–600.

WEST B. J., PALMER S. K., DENG S., PALU A. K. Antimicrobial activity of an iridoid rich extract from *Morinda citrifolia* fruit, **Curr. Res. J. Biol. Sci.**, 4 (1), pp. 52–54, 2012.

WASTERNAK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. **Annals of Botany**, v.111, n.6, p. 1021–1058, 2013.

Zhang, X.; Sheng, J.; Li, F.; Menga, D. e Shen, L. (2012) - Methyl jasmonate alters arginine catabolism and improves postharvest chilling tolerance in cherry tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 64, n. 1, p. 160–16