

Crescimento e produção de betacianinas em plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro* sob elicitación por sal

Growth and pigment production of *Alternanthera philoxeroides* plants cultured *in vitro* under salt elicitation

Alitcia Moraes Kleinowski¹, Marcia Vaz Ribeiro², Simone Ribeiro Lucho³, Isabel Rodrigues Brandão⁴, Cristini Milech⁵, Eugenia Jacira Bolacel Braga⁶

RESUMO

A espécie *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. conhecida popularmente como erva-de-jacaré, está presente em formações pioneiras do tipo restinga, geralmente em terrenos arenosos, com algum teor salino, podendo ser considerada uma planta potencialmente tolerante a salinidade. Em sua constituição química foram encontrados, dentre outros fitoquímicos, pigmentos da classe das betalaínas. Esses pigmentos naturais nitrogenados ganharam notoriedade depois que passaram a ser empregados como aditivos para produtos alimentícios e nutracêuticos devido as suas propriedades atóxicas. Técnicas de cultura *in vitro* proporcionam uma série de vantagens para o estudo de plantas medicinais, pois possibilitam o uso de elicitores abióticos, como o NaCl, com o intuito de aumentar a biossíntese do metabólito de interesse. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as características morfológicas de plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro*, sob diferentes concentrações de NaCl, e analisar a influência deste elicitador na produção do pigmento betacianina. Para isso, segmentos nodais de plantas pré-aclimatizadas *in vitro*, foram inoculados em meio MS acrescido de concentrações crescentes de NaCl (0; 50; 100; 150; 200 e 250 mM), permanecendo, por 35 dias, em sala de crescimento. Após esse período foram avaliados os parâmetros de crescimento: altura, número de gemas, brotos, raiz, comprimento da maior raiz, massa fresca da parte aérea e concentração de betacianina, em folhas e caules. A adição de NaCl ao meio de cultura afetou de forma negativa os seguintes parâmetros de crescimento, altura, número de gemas, número de brotos, número e comprimento da raiz. Em relação ao sistema radicular, tanto para número, como para comprimento da raiz, as maiores médias foram obtidas em plantas cultivadas em meio sem adição de NaCl. As maiores concentrações de betacianina foram encontradas nos caules de plantas cultivadas em meio MS com 50 mM de NaCl. Conclui-se que plantas de *A. philoxeroides* elicitadas com cloreto de sódio apresentam uma diminuição nos

parâmetros morfológicos avaliados, porém em baixas concentrações há um estímulo da síntese de betacianina.

Palavras-chave: plantas medicinais, betalaínas, erva-de-jacaré.

ABSTRACT

The species *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. popularly known as, “alligator- weed” is present in pioneer formations of salt marsh type ecosystem, usually in sandy soils, with some salt content and it can be considered a potentially salinity tolerant plant. In their chemical composition we found other phytochemicals of betalains grade pigments. These nitrogenous natural pigments gained notoriety after being used as additives for food products and nutraceuticals due to its non-toxic properties. Vitro culture techniques provide a number of advantages to the study of plants, because they enable the use of abiotic elicitors, such as NaCl, in order to increase the biosynthesis of the metabolite of interest. Thus, the aim of this study was to evaluate the morphological characteristics of *A. philoxeroides* plants grown in vitro under different concentrations of NaCl, and analyze the influence of this elicitor in production of betacyanin pigment. For this purpose, nodal pre-acclimated plants in vitro were inoculated in MS medium supplemented with increasing concentrations of NaCl (0; 50; 100; 150; 200 and 250 mM), remaining for 35 days in a growth room. After this period we evaluated the growth parameters: time, number of buds, shoots, roots, the greater root length, fresh weight of shoot and betacyanin concentration in leaves and stems. The addition of NaCl to the culture medium negatively affected the following growth parameters: - time, number of buds, number of shoots, number and root length. Regarding the root system, both for number and for root length, the highest average was obtained from plants grown in medium without addition of NaCl. The highest concentrations were found in betacyanin stems of plants grown in MS medium at 50 mM NaCl. It concludes that plants of *A. philoxeroides* elicited with sodium chloride show a decrease in the assessed morphological parameters, but in low concentrations there is a stimulation of betacyanin synthesis.

Keywords: medicinal plants, betalains, alligator- weed.

INTRODUÇÃO

O uso das plantas medicinais para prevenção, tratamento e/ou cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana (ULRICH-MERZENICH, 2014). Primeiramente, foi somente por meio de observações que o homem passou a conhecer seus efeitos benéficos ou maléficos, catalogando essas plantas medicinais de acordo com sua eficácia e modo de administrar, sem ao menos conhecer suas propriedades, constituição e composição química (ENECHI; ODO; WUAVE, 2013).

Posteriormente, foi postulado que essas plantas terapêuticas possuíam um arsenal químico natural, que possibilitaria a descoberta de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo, desenvolvendo várias ciências, incluindo a química dos produtos naturais (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

Esses produtos naturais, também chamados de metabólitos secundários presente nas plantas, possuem uma biossíntese complexa que os difere dos metabólitos primários, pela baixa produção e heterogeneidade dentro das plantas. Ainda, estão sujeitas à influência de diferentes variáveis ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) e representam uma interface química entre os vegetais e o ambiente circundante onde fatores bióticos e abióticos interferem na qualidade e na quantidade de produtos secundários de uma planta, em um determinado momento.

Pertencente a essa cena, está a espécie medicinal *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. , popularmente conhecida como erva-de-jacaré, que vêm sendo utilizada como anti-inflamatória e diurética (RATTANATHONGKOM et al., 2009). Ela é encontrada em formações pioneiras do tipo restinga, geralmente em terrenos arenosos recentes, com algum teor salino (BLUM, 2008), podendo ser considerada uma planta potencialmente tolerante à salinidade (GAO et al., 2008). Em sua constituição química foram encontrados flavonoides glicosilados, saponinas e betalaínas conferindo-lhe ação antitumoral e antiviral contra HSV-1, HSV-2, citomegalovírus, vírus do sarampo, vírus MUMPS e HIV (Human- Immunodeficiency-virus) (FANG et al., 2007, RATTANATHONGKOM et al., 2009).

As betalaínas são pigmentos naturais, N-heterocíclicos, solúveis em água, que substituem as antocianinas nas famílias da ordem Caryophyllales (VOLP; VOGT; SCHLIEMANN, 2009), e podem ser divididas em dois grupos estruturais: as betacianinas (vermelho ao vermelho violeta) e as betaxantinas (amarelo). A importância bioativa destes pigmentos é estudada por diversos autores tendo sido comprovados os efeitos antivirais e antimicrobianos dos pigmentos betalaínas (STRACK; VOGT; SCHLIEMANN, 2003).

É importante salientar que os compostos supracitados, são mais eficientes quando produzidos pela própria planta. Por outro lado, a obtenção dos mesmos por

reações sintéticas se torna complexa devido à presença de estruturas polihidroxiladas, dificultando o seu aproveitamento farmacológico. Pensando nisso, nas últimas duas décadas, pesquisadores têm focado em estudos de biotecnologia vegetal, como alternativa para essa produção, usando culturas celulares ou mesmo plantas inteiras (MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

Por exemplo, as técnicas de cultura *in vitro* que proporcionam uma série de vantagens para o estudo de plantas medicinais, como as do gênero *Alternanthera*, pois possibilitam a manipulação da composição fitoquímica dessas plantas de maneira mais simples, confiável e previsível, evitando a interferência de fatores externos (PARK et al., 2008). Aliado a isso, pode ser empregado o uso de elicitores abióticos com o intuito de aumentar a biossíntese do metabólito de interesse (KORSANGRUANG et al., 2010). O aumento de metabólitos secundários por elicitação é uma das estratégias encontradas para atender a demanda comercial de compostos de interesse industrial (RAMAKRISHNA; RAVISHANKA, 2011). Estes indutores que podem ser físicos e/ou químicos ao entrar em contato com as plantas desencadeariam um estresse celular (ZHAO; VERPOORTE, 2007) induzindo um aumento dos metabólitos secundários tais como os pigmentos betalâmicos, flavonoides e outros compostos (GEORGIEV et al., 2008).

Algumas espécies de *Alternanthera* já estão sendo utilizadas como modelos biológicos para estudos sobre a fisiologia do metabolismo secundário, tanto na produção como no armazenamento e aproveitamento de moléculas naturais como as betacianinas (KLEINOWSKI et al., 2014, RIBEIRO et al., 2014, RODRIGUES-BRANDÃO et al., 2014).

Este trabalho objetivou avaliar as características morfológicas de plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro*, sob diferentes concentrações de NaCl, e analisar a influência deste elicitor na produção do pigmento betacianina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Plantas de *A. philoxeroides* (erva-de-jacaré), provenientes do município de Rio Grande, no Rio Grande do Sul, tiveram sua identificação taxonômica confirmada por meio da chave de identificação para Amaranthaceae e catalogada no Herbário Pel sob o número 24.535. Para o estabelecimento *in vitro*, foram utilizados segmentos nodais de brotações novas, contendo uma ou duas gemas axilares, de

plantas mantidas, por 15 dias, na casa de vegetação. Os segmentos foram lavados em água corrente e em água destilada com agitação mecânica por 15 minutos. Posteriormente, o material vegetal foi imerso em hipoclorito de sódio 1%, com três gotas de tween (20min), e em álcool 70%, por 20 segundos. Todos os procedimentos foram intercalados com banhos em água estéril.

Segmentos nodais de plantas pré-aclimatizadas *in vitro*, foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas acrescido de concentrações crescentes de NaCl (0; 50; 100; 150; 200 e 250 mM), permanecendo, por 35 dias, em sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo e $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons.

Após esse período foram avaliados os parâmetros de crescimento: altura, número de gemas, brotos, raiz, comprimento da maior raiz, massa fresca da parte aérea e concentração de betacianina, em folhas e caules. Para esta última análise, o material vegetal foi macerado em 5 mL de água destilada e centrifugado a 13.632g a 4°C por 15 minutos. A quantificação de betacianina seguiu a metodologia de Cai et al. (1998), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 536 e 650 nm e a concentração obtida expressa em mg de Amarantina por 100g de massa fresca.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto de seis tratamentos e quatro repetições, sendo cada representada por um frasco contendo cinco explantes. A análise de betacianina foi realizada em esquema fatorial 6x2 (seis tipos de meio e dois órgãos diferentes). Os dados foram submetidos à análise da variância, regressão polinomial e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%), com auxílio do software WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de NaCl ao meio de cultura afetou de forma negativa os parâmetros de crescimento, altura, número de gemas, número de brotos, número e comprimento da raiz.

O aumento da concentração de NaCl implicou na redução da altura das plantas de *A. philoxeroides* (Figura 1a), podendo ser devido a diversos fatores, tais como: o efeito tóxico dos íons que foram absorvidos; o baixo potencial osmótico e hídrico das células em relação ao meio de cultura testado; bem como a utilização de

energia metabólica no processo de ajustamento osmótico. Resultados semelhantes foram encontrados em espécies como *Morinda citrifolia* e *M. pubescens* (NIVAS; GOIKWAD; CHAVAN, 2011), *Solanum lycopersicum* (ROMERO-ARANDA et al., 2001) e em outras espécies de dunas como *Spartina ciliata*, *Blutaparon portulacoides*, *Cakile maritima* (CORDAZZO; SEELINGER, 2003). A semelhança de tais resultados mostra que o menor crescimento nos vegetais é uma resposta geralmente causada pela presença de sal no meio. Com influência da alta salinidade, a expansão celular pode ser reduzida pelo acúmulo de sais na parede celular, que pode diminuir o turgor e, conseqüentemente, o crescimento (CORDEIRO, 2001).

A variável número de gemas foi afetada com o aumento da concentração no meio de cultura, sendo tal efeito mais evidente nas concentrações mais elevadas do sal (Figura 1b). Dentre os prejuízos causados pelo estresse salino, estão o retardo ou a inibição no aparecimento das gemas e atrofiamento das mesmas, sendo, portanto, um efeito comum aos vegetais expostos ao sal (MUSCOLO; PANUCCIO; SIDARI, 2003).

A concentração de 250 mM de NaCl promoveu uma diminuição de 38% na formação de novos brotos em relação às plantas crescidas em meio MS sem adição de cloreto de sódio (Figura 1c). Concentrações inferiores a esta não diferiram entre si, concordando com resultados obtidos por Pérez-Tornero et al. (2009) e Sotiropoulos; Dimassi (2004), que relataram que baixas concentrações não apresentam efeito negativo sobre essa variável, pois *in vitro* não ocorre diferença de osmolaridade.

Plantas cultivadas em meio MS, livre de NaCl, apresentaram as maiores médias para número de raiz (13,35), sendo as concentrações crescentes de sal prejudiciais para este órgão, chegando a uma diminuição de quase 80% na maior concentração testada (Figura 1d).

Até a concentração de 100 mM de NaCl não ocorreram modificações no comprimento da raiz em relação ao controle (1,85 cm), porém a partir de 150 mM a diminuição foi gradativa, chegando a 0,19 cm na concentração de 250 mM (Figura 1e).

Em estudo sobre diferentes concentrações de Fernandes et al. (2003) sobre o efeito salinidade no crescimento de *Bactris gasipaes*, verificaram que o sistema radicular foi a parte da planta mais afetada pela salinidade, diferentemente do que

aconcorre na maioria das espécies, em que a parte aérea é a mais sensível ao estresse salino do que a raiz.

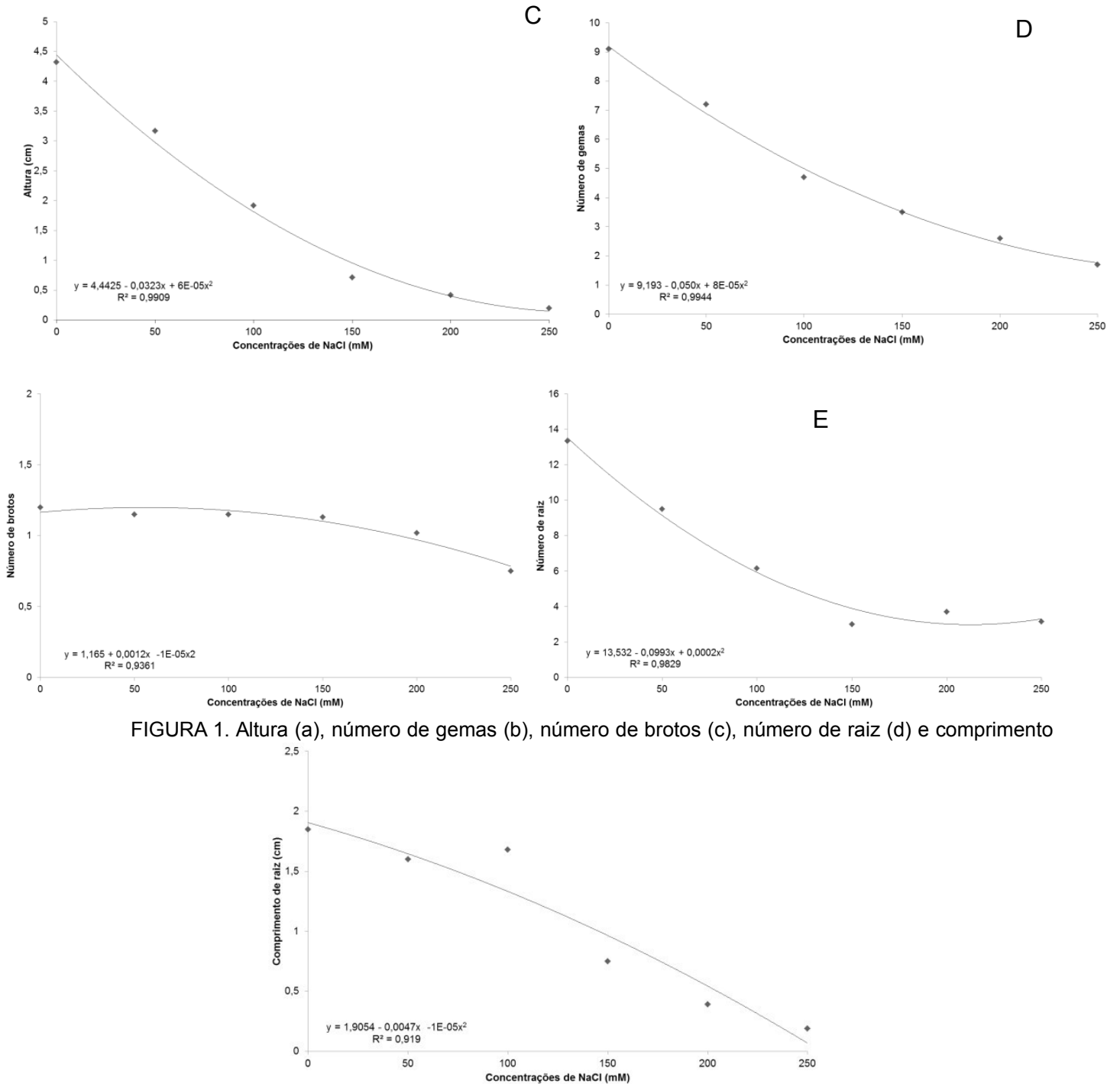


FIGURA 1. Altura (a), número de gemas (b), número de brotos (c), número de raiz (d) e comprimento

de raiz (e) de plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas in vitro, por 35 dias, em meio MS, com diferentes concentrações de NaCl.

Em relação à quantificação de betacianina ocorreu diferença estatística tanto em relação aos órgãos, como para os meios testados, sendo as maiores

concentrações de betacianina encontradas nos caules de plantas cultivadas em meio MS com 50 mM de NaCl. Verificando o acúmulo de betacianina em *A. philoxeroides in vitro*, sob eliciação com tirosina, Kleinowski et al. (2014) também encontraram diferenças significativas nos teores desses pigmentos entre caules e folhas, constatando um expressivo acúmulo de betacianina nos caules. Os autores desse trabalho ponderaram, que a capacidade de síntese de betacianina por uma planta não é bem elucidada até o presente momento, no entanto é esperado haver um limite celular, em cada órgão, de produção e acúmulo desse composto.

Conforme observado na figura 2, não foi obtido massa de folhas suficientes para a realização da análise, nas concentrações acima de 150 mM, pois não houve formação de gemas, isso pode ter ocorrido porque os sais exercem efeitos de forma direta ou indireta, lenta ou brusca, total ou parcial sobre o desenvolvimento das plantas, Schossler et al. (2012). Esses autores também destacaram que os efeitos do excesso de sais, principalmente o Na e o Cl, provocam redução do desenvolvimento vegetal, promovendo distúrbios fisiológicos impedindo o crescimento normal das plantas.

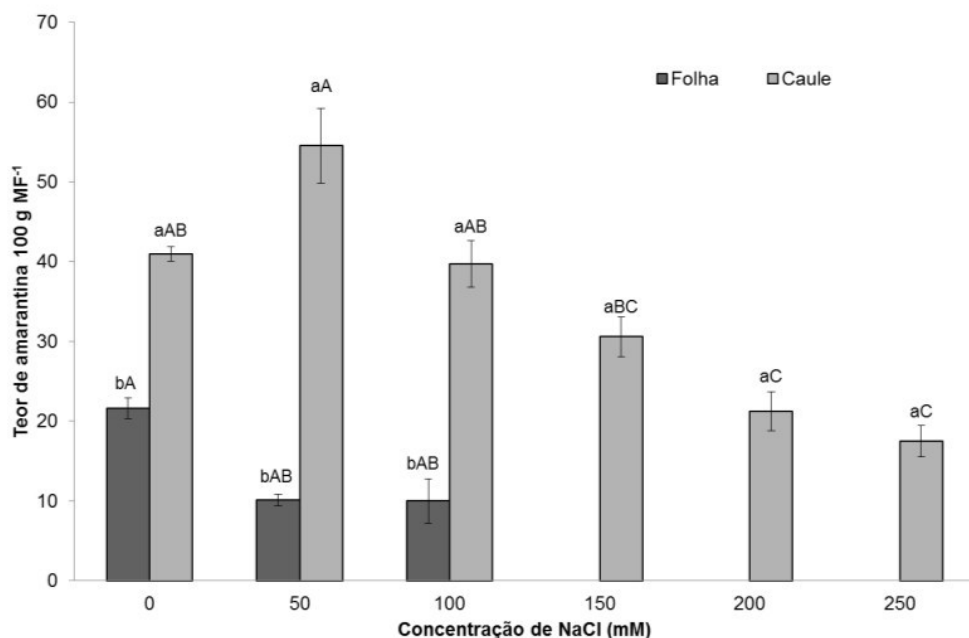


FIGURA 2. Quantificação de betacianina em folhas e caules de plantas de *Alternanthera philoxeroides* cultivadas *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de NaCl, por 35 dias. *Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo que, letras minúsculas comparam os diferentes órgãos dentro de cada concentração e letras maiúsculas comparam órgãos iguais nas diferentes concentrações. As barras representam o erro padrão.

Por outro lado, a salinidade induz o acúmulo de aminoácidos como a fenilalanina e a tirosina, sendo a última o aminoácido precursor na biossíntese das betalainas, além disso, é comum em plantas elicitadas que a via do metabolismo secundário originados desses aminoácidos aumente (ZHANG et al., 2011), proporcionando um acúmulo de compostos nitrogenados, como as betacianinas (MANSOUR, 2000, AZIZ; KHAN, 2001).

Em outro estudo utilizando sal como elicitador de betacianinas em plantas de *A. piloxeroides*, Ribeiro et al. (2014) verificaram que houve uma interação significativa entre os órgãos (caules e folhas) e a concentração de NaCl, sendo que nos caules na maior concentração de sal utilizada, 400 mM, foi encontrado um aumento de cerca de 80% em comparação ao controle.

Em plantas de *A. tenella* cultivadas *in vitro*, a aplicação exógena do fitohormônio ácido salicílico foi testada por Rodrigues-Brandão et al. (2014), que relataram que esta molécula na concentração de 300 µM capaz de induzir respostas positivas na produção de betacianina com um aumento de em média 10% em relação ao controle.

As betacianinas são pigmentos nitrogenados, de coloração vermelho-violeta e juntamente com as betaxantinas pertencem à classe das betalainas (Volp et al. 2009). O aumento da síntese deste pigmento, observado no presente trabalho, está de acordo com os resultados obtidos por Wang et al. (2008) com *Suaeda salsa*, pertencente à família Chenopodiaceae, que observaram aumento no conteúdo de betacianina quando as plantas foram submetidas ao estresse salino. Este mesmo autor ainda sugere que as betacianinas podem funcionar como osmólitos na defesa de processos fisiológicos contra estresses abióticos através da modulação do pool de aminoácidos.

Esses estudos ratificam o aludido por Ramakrishna; Ravishanka, (2011) que indicaram que aumento de metabólitos secundários por elicitação foi uma das melhores estratégias encontradas para atender a demanda comercial de compostos de interesse industrial.

CONCLUSÃO

Plantas de *A. piloxeroides* submetidas à elicitação por NaCl, cultivadas *in vitro*, sofrem interferências nos seus parâmetros morfofisiológicos, porém são

capazes de alterar o seu metabolismo secundário, nos diferentes órgãos, aumentando o fluxo de produção de betacianina, principalmente, nos caules.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZIZ, I.; KHAN, M.A. Experimental assessment of salinity tolerance of *Ceriops tagal* seedlings and saplings from the Indus delta, Pakistan. **Aquatic Botany**, v.70, p.259–268, 2001.

BLUM, C.T. **Lista Preliminar de Espécies Vegetais da Formação Pioneira de Influência Marinha (Restinga) no Paraná** - versão 2008. FLORAPARANÁ, Sociedade Chauá. Disponível em www.chaua.org.br/restinga, acessado em 01/07/2016.

CAI, Y.; SUN, M.; WU, H.; HUANG, R.; CORKE, H. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2063-2070, 1998.

CORDAZZO, C.V.; SEELINGER, U. Reproduction and vegetative regeneration in *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae) on backshores of southern Brazil. **Journal of Coastal Research**, v.35, p.481-485, 2003.

CORDEIRO, G.G. **Salinidade em agricultura irrigada (conceitos básicos e práticos)**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-árido, 2001. 38p.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. New Horizons for Old Drugs and Drug Leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 703-723, 2014.

ENECHI, O.C.; ODO, C.E.; WUAVE, C.P. Evaluation of the in vitro anti-oxidant activity of *Alternanthera brasiliana* leaves. **Journal Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 919-924, 2013.

FANG, J.B. et al. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian natural products research**, v.9, p.511-515, 2007.

FANG, J.B. et al. Cytotoxic triterpene saponins from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian natural products research**, v.11, p.261-266, 2009.

FERNANDES, A.R.; CARVALHO, J.D.; CURI, N.; GUIMARÃES, P.D.T.; PINTO, J.E. B.P. Crescimento de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) sob diferentes níveis de salinidade. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.278-284, 2003.

GAO, J.; XIAO, Q.; YIN, L.; HE, G. Isolation of cDNA clones for genes up-regulated in drought-treated *Alternanthera philoxeroides* root. **Journal Molecular Biology Reports**, v. 35, p. 485-488, 2008.

GEORGIEV, V.; ILIEVA, M.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Betalain production in plant *in vitro* systems. **Acta Physiologica Plantarum**, v.30, p. 581-593, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

KLEINOWSKI, A.M.; RODRIGUES, I.C.S.; RIBEIRO, M.V.; EINHARDT, A.M.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Pigment production and growth of *Alternanthera* plants cultured *in vitro* in the presence of tyrosine. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v. 57, p. 253-260, 2014.

KORSANGRUANG, S.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHINTAPAKORN, Y., SARALAMP, P.; PRATHANTURARUG, S. Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.103, p.333–342, 2010.

MACHADO, A., CONCEIÇÃO, A.R. **Programa estatístico WinStat – Sistema de Análise Estatístico para Windows**, versão 2.0. Pelotas, RS, 2002.

MANSOUR, M.M.F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v.43, p.491–500, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M. R.; SIDARI, M. Effects of salinity on growth, carbohydrate metabolism and nutritive properties of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum* Hoscht). **Plant Science**, v.164, p.1.103 - 1.110, 2003.

MCCHESENEY, J.D.; VENKATARAMAN, S.K.; HENRI, J.T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v.68, p. 2015-2022, 2007.

NIVAS, D.; GOIKWAD, D. K; CHAVAN, P.D. Physiological responses of two *Morinda* species under saline conditions. **American Journal of plant Physiology**, v.3, p.157-166, 2011.

PARK, S.U.; UDDIN, R.; XU, H.; KIM, Y.K., ; LEE, S. Y. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. **African Journal of Biotechnology**, v.7 p.4959-4965, 2008.

PÉREZ-TORNERO, O.; TALLÓN, C.I.; PORRAS, I.; NAVARRO, J.M. Physiological and growth changes in micropropagated *Citrus macrophylla* explants due to salinity. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.1923-1933, 2009.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKA, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, p. 1720-1731, 2011.

RATTANATHONGKOM, A.; LEE, J.B.; HAYASHI, K.; SRIPANIDKULCHAI, B.O.; KANCHANAPOOM, T.; HAYASHI, T. Evaluation of saponin IV isolated from

Alternanthera philoxeroides for its potency against viral replication. **Planta Medica**, v.75, p.829-835, 2009.

RIBEIRO, M.V.; DEUNER, S.; BENÍTEZ, L.C. EINHARDT, A.M. PETERS J.A.; BRAGA E.J.B. Betacyanin and antioxidant system in tolerance to salt stress in *Alternanthera philoxeroides*. **Agrociencia**, v. 48, p.199-210, 2014

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

ROMERO-ARANDA, R.; SORIA, T.; CUARTERO, J. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**, v.160, p.265 – 272, 2001.

SOTIROPOULOS, T.; DIMASSI, K.N. Response to increasing rates of boron and NaCl on shoot proliferation and chemical composition of in vitro kiwi fruit shoot cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 9, p. 285–289, 2004.

SCHOSSLER, T.R.; MACHADO, D.M.; ZUFFO, A.M.; DE ANDRADE, F.R.; PIAULINO, A. C.; PIAUÍ, B.J.B Salinidade: efeitos na fisiologia e na nutrição mineral de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 1563-1578, 2012.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v.62, p.247–269, 2003.

ULRICH-MERZENICH, G. S. Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products–Potential and challenges for drug development Review paper. **Synergy**, v. 1, p. 59-69, 2014.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e nutrição**, v. 20, p. 157-166, 2009.

WANG, C.Q.; ZHAO, J.Q.; CHEN, M.; WANG, B.S. Identification of Betacyanin and Effects of Environmental Factors on Its Accumulation in Halophyte *Suaeda salsa*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.32, n.2, p.195-201, 2008.

ZHAO, J.; VERPOORTE, R. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. **Phytochemistry**, v. 6, p. 435-457, 2007.

ZHANG, H.C.; LIU, J. M.; LU, H.Y.; GAO, S.L. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment. **Plant Cell Reports**, v.28, p.1205–1213, 2011.