



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

MARCELO DUARTE

**PRODUÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM BROTO DE FEIJÃO MUNGO
EM FUNÇÃO DE LUMINOSIDADE E APLICAÇÃO EXÓGENA DE ELICITORES**

Presidente Prudente - SP
2023



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

MARCELO DUARTE

**PRODUÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM BROTOS DE FEIJÃO MUNGO
EM FUNÇÃO DE LUMINOSIDADE E APLICAÇÃO EXÓGENA DE ELICITORES**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade do Oeste Paulista como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientadora:
Dr^a. Ceci Castilho Custódio

Presidente Prudente - SP
2023

633.372
D812p

Duarte, Marcelo.

Produção e atividade antioxidante em brotos de feijão mungo em função de luminosidade e aplicação exógena de elicitores / Marcelo Duarte. –Presidente Prudente, 2023.

93 f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientador: Prof^ª. Dra. Ceci Castilho Custódio

1. *Vigna radiata* L. 2. Capacidade antioxidante. 3. Luminosidade. 4. Eustresse. 5. Broto. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “PRODUÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE BROTO DE FEIJÃO MUNGO EM FUNÇÃO DE LUMINOSIDADE E DA APLICAÇÃO EXÓGENA DE ELICITORES”

AUTOR(A): MARCELO DUARTE

ORIENTADOR(A): Dra. CECI CASTILHO CUSTÓDIO

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR(A) em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

CECI CASTILHO CUSTÓDIO (Orientadora)

UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

ANDREIA CRISTINA SILVA HIRATA

APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Pólo Regional da Alta Sorocabana – Presidente Prudente/SP

AMARÍLIS BERALDO RÓS

APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Pólo Regional da Alta Sorocabana – Presidente Prudente/SP

EDGARD HENRIQUE COSTA SILVA

UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

JOSÉ EDUARDO CRESTE

UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Data da realização: Presidente Prudente, 18 de Dezembro de 2023.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que sempre foi o autor da minha vida e do meu destino, me permitindo concluir este trabalho.

Este trabalho também é dedicado às pessoas que estiveram ao meu lado ao longo de toda a vida: a meu pai e amigo, Onofre Urias Duarte e à memória de minha mãe, Dirce de Jesus Duarte, que se faz presente em todos os dias da minha vida. Sei que, de algum lugar, olha por mim. Dedico à minha irmã Mirian Duarte e à minha sobrinha Carolina Duarte, que sempre me deram apoio.

Dedico este trabalho a todo do Programa de Pós-Graduação da Universidade do Oeste Paulista, corpo docente e discente, a quem fico lisonjeado por fazer parte.

AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram na conclusão de mais um passo na minha vida, para que esta tese se concretizasse.

Em primeiro lugar à Professora Doutora Ceci Castilho Custódio, minha orientadora, pelo aconselhamento assertivo, pelo apoio e pela disponibilidade, que contribuiu em muito para melhorar a profundidade e clareza da investigação, pela sua amizade.

Agradeço de igual forma ao professor Doutor Nelson Barbosa Machado Neto, por sua disponibilidade, colaboração e aconselhamentos durante o processo.

À Cris, responsável pelo Laboratório pelo companheirismo e carinho durante todo o período e aos colegas do programa e da graduação, que tanto colaboraram durante o transcorrer das análises biométricas e bioquímicas.

Agradecimentos especiais aos grandes amigos, que sempre me apoiaram durante o doutorado: Emerson Ferreira da Silva, Matheus Monteiro, Fernanda Quineli Alves Nagao, Renata Barbieri, Claudemir Monteiro Lima e Renilda Terezinha Monteiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimento ao Programa de Pós-Graduação da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, em função da bolsa de estudo ofertada.

“Não devemos chamar o povo à escola para receber instruções, postulados, receitas, ameaças, repreensões e punições, mas para participar coletivamente da construção de um saber, que vai além do saber de pura experiência feita, que leve em conta as suas necessidades e o torne instrumento de luta, possibilitando-lhe ser sujeito de sua própria história”. (Paulo Freire)

RESUMO

Produção e atividade antioxidante em brotos de feijão mungo em função de luminosidade e aplicação exógena de elicitores

A utilização de elicitores (naturais ou sintéticos), têm sido avaliadas como estratégia biotecnológica que visa o aumento da síntese de compostos secundários de planta de interesse comercial. O objetivo deste trabalho será o de verificar o efeito da aplicação exógena do ácido salicílico (AS), ácido ascórbico (AC), sacarose (SAC) e aplicação de eustresse por meio de salinidade sobre a produção de biomassa e o conteúdo dos compostos fenólicos antioxidantes em brotos de *Vigna radiata* L. Os tratamentos foram aplicados durante a embebição das sementes nas concentrações de zero, 45, 90, 135, 180, 225 mg L⁻¹, para ácido salicílico (AS); zero; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5 g L⁻¹, para ácido ascórbico (AC); zero; 0,25, 0,5 e 1%, para solução de sacarose e zero; 25, 50 e 75 mM, para a solução de cloreto de sódio (NaCl). O efeito dos elicitores sobre o metabolismo das plantas foi avaliado através de parâmetros biométricos de crescimento (produção de biomassa aérea e radicular) e parâmetros bioquímicos (atividade das enzimas superóxido dismutase, guaiacol peroxidase, proteína total, atividade antioxidante porcentual e por concentração inibitória de 50% da atividade oxidante do DPPH, conteúdo total de fenóis e flavonóides). Os elicitores aplicados em dosagens maiores afetaram negativamente o crescimento dos brotos, o que não é interessante comercialmente. As melhores relações de massa seca total (MST) foram observadas para os tratamentos seguintes: AS produzido no claro, nas dosagens que variaram entre 45 e 225 mg.L⁻¹, AC no escuro para a dosagem 0,3125 g.L⁻¹ e dosagens de 0,3125 a 1,25 g.L⁻¹ no claro; SAC produzido no escuro, para todas as dosagens testadas e dosagens de 0,25 e 1%, quando produzidos no escuro, assim como para a dosagem de solução salina a 50 mM, produzida no escuro. O AS aplicado no claro propiciou a maior relação MST.CT⁻¹. A aplicação exógena dos elicitores propiciou com que todos estimulasse funções antioxidantes em brotos de feijão. No comparativo entre as doses, para a atividade antioxidante, os tratamentos que se sobressaíram ocorreram para a AC a 2,5 g L⁻¹ produzidos no claro e no escuro e para dosagens de SAC de 0,5 a 1% produzidos no claro.

Palavras-chave: *Vigna radiata* L.; broto; capacidade antioxidante; luminosidade; eustresse.

ABSTRACT

Production and antioxidant activity in mungo bean sprouts as a function of light and exogenous application of elicitors

The use of elicitors (natural or synthetic) has been evaluated as a biotechnological strategy that aims to increase the synthesis of secondary plant compounds of commercial interest. The objective of this study will be to verify the effect of the exogenous application of salicylic acid (SA), ascorbic acid (AC), sucrose (SAC) and application of eustress through salinity on the biomass production and the content of antioxidant phenolic compounds in *Vigna radiata* L. sprouts. The treatments were applied during seed imbibition at concentrations of zero, 45, 90, 135, 180, 225 mg L⁻¹, for salicylic acid (SA); zero; 0.3125; 0.625; 1.25 and 2.5 g L⁻¹, for ascorbic acid (AC); zero; 0.25, 0.5 and 1%, for sucrose solution and zero; 25, 50 and 75 mM, for sodium chloride (NaCl) solution. The effect of elicitors on plant metabolism was evaluated through biometric growth parameters (production of aerial and root biomass) and biochemical parameters (activity of superoxide dismutase, guaiacol peroxidase, total protein, percentage antioxidant activity and by 50% inhibitory concentration of DPPH oxidizing activity, total content of phenols and flavonoids). Elicitors applied at higher doses negatively affected shoot growth, which is not commercially interesting. The best total dry mass (TDM) ratios were observed for the following treatments: AS produced in the light, at dosages ranging from 45 to 225 mg.L⁻¹; AC in the dark for the dosage of 0.3125 g.L⁻¹ and dosages of 0.3125 to 1.25 g.L⁻¹ in the light; SAC produced in the dark, for all dosages tested and dosages of 0.25 and 1%, when produced in the dark, as well as for the dosage of 50 mM saline solution, produced in the dark. AS applied in the light provided the highest TDM.CT⁻¹ ratio. The exogenous application of the elicitors allowed all of them to stimulate antioxidant functions in bean sprouts. In the comparison between the doses, for the antioxidant activity, the treatments that stood out occurred for AC at 2.5 g L⁻¹ produced in the light and in the dark and for SAC dosages of 0.5 to 1% produced in the light.

Keywords: *Vigna radiata* L.; shoot; antioxidant capacity; luminosity; eustress.

LISTA DE SIGLAS

AA	– Atividade Antioxidante
AC	– Ácido Ascórbico
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APX	– Ascorbato Peroxidase
AS	– Ácido Salicílico
CAT	– Catalase
CPA	– Comprimento da parte aérea
CR	– Comprimento da raiz
CT	– Comprimento total
DMAPP	– Dimetilalil Pirofosfato
EROs	– Espécies Reativas de Oxigênio
FE	– Conteúdo Total de Fenóis
FFs	– Alimentos Funcionais
FLA	– Flavonoides
GSH	– Glutathione
IC50	– Concentração Inibitória
IPP	– Isopentenil Pirofosfato
L	– Equação linear
MEP	– Metileritritol Plastidial
MSPA	– Massa seca da parte aérea
MSR	– Massa seca da raiz
MST	– Massa seca total
MVA	– Ácido mevalônico
PAL	– Phenylalanine Ammonia Lyase
PROT	– Proteína solúvel
PRX	– Guaiacol Peroxidase
R R/PA	– Relação raiz parte aérea
Q	– Equação quadrática
SAL	– Solução salina

SAC – Sacarose
SOD – Superóxido dismutase
UR – Umidade relativa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Visão simplificada das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.....	29
Figura 2 -	Rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico	30
Figura 3 -	Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina.....	31
Figura 4 -	Fluxograma simplificado da rota de ácido chiquímico.....	32
Figura 5 -	Formação do $O_2^{\cdot-}$ em cadeias de transporte de elétrons (a) na fotossíntese ocorre no PS-I; (b) na respiração nos complexos I e III.....	34
Figura 6 -	Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido salicílico para Comprimento da Parte Aérea (cm). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	53
Figura 7 -	Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido salicílico para Comprimento Total (cm) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	54
Figura 8 -	Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido salicílico para Relação R R/PA (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	55
Figura 9 -	Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido salicílico (para Atividade Antioxidante (%)) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	57
Figura 10 -	Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido ascórbico para Comprimento da Parte Aérea (cm) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	59

Figura 11 -	Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido ascórbico para Comprimento Total (cm) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	60
Figura 12 -	Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido ascórbico para Massa Seca Total (g) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	61
Figura 13 -	Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido ascórbico para Atividade PRX (nmol of H ₂ O ₂ (mg protein) ⁻¹ min ⁻¹ (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	63
Figura 14 -	Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido ascórbico para Proteína Solúvel (mg gMS ⁻¹) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	64
Figura 15 -	Desdobramento da interação entre as condições para Comprimento da Parte Aérea (cm) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	66
Figura 16 -	Desdobramento da interação entre as condições para Comprimento Total (cm).....	67
Figura 17 -	Desdobramento da interação entre as condições para Atividade Antioxidante (%) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	69
Figura 18 -	Desdobramento da interação entre as condições para Flavonoides Totais (mg (100 g extrato graxo) ⁻¹) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	70
Figura 19 -	Desdobramento da interação entre as condições para Comprimento da Parte Aérea (cm) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam	

	diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	73
Figura 20 -	Desdobramento da interação entre as condições para Flavonoides Totais (mg (100 g extrato graxo) ⁻¹) (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.).....	75
Figura 21-	Índice de matéria seca total (I MST) de brotos de feijão submetidos a diferentes concentrações, elicitores e condição de crescimento no escuro e no claro. Ácido Salicílico (AS 0; 45; 90; 135; 180 e 225 g.L ⁻¹), Ácido Ascórbico (AC 0; 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5 g.L ⁻¹), Sacarose (SAC 0; 0.25; 0.5; 1%), solução salina (SAL 0; 25; 50; 75 mM).....	76
Figura 22 -	Índice de matéria seca total por comprimento total (I MST. CT-1) de brotos de feijão submetidos a diferentes concentrações, elicitores e condição de crescimento no escuro e no claro. Ácido Salicílico (AS 0; 45; 90; 135; 180 e 225 g.L ⁻¹), Ácido Ascórbico (AC 0; 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5 g.L ⁻¹), Sacarose (SAC 0; 0.25; 0.5; 1%), solução salina (SAL 0; 25; 50; 75 mM).....	77
Figura 23 -	Índice de concentração inibitória (I IC50) de brotos de feijão submetidos a diferentes concentrações, elicitores e condição de crescimento no escuro e no claro. Ácido Salicílico (AS 0; 45; 90; 135; 180 e 225 g.L ⁻¹), Ácido Ascórbico (AC 0; 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5 g.L ⁻¹), Sacarose (SAC 0; 0.25; 0.5; 1%), solução salina (SAL 0; 25; 50; 75 mM).....	78
Figura 24 -	Índice de atividade antioxidante (I AA) de brotos de feijão submetidos a diferentes concentrações, elicitores e condição de crescimento no escuro e no claro. Ácido Salicílico (AS 0; 45; 90; 135; 180 e 225 g.L ⁻¹), Ácido Ascórbico (AC 0; 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5 g.L ⁻¹), Sacarose (SAC 0; 0.25; 0.5; 1%), solução salina (SAL 0; 25; 50; 75 mM).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação geral dos fatores que afetam as preferências dos consumidores e a aceitação de produtos funcionais.....	27
Tabela 2 -	Tratamento dos brotos com a aplicação exógena de elicitores diversos.....	47
Tabela 3 -	Comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), comprimento total (CT, cm), relação raiz/parte aérea em comprimento (R R/PA), massa seca de parte aérea (MSPA, g), massa seca de raiz (MSR, g) e massa seca total (MST, g) de brotos de feijão tratados com solução de ácido salicílico.....	52
Tabela 4 -	Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (PRX), proteína solúvel (PROT), atividade antioxidante (AA), concentração inibitória (IC50) e conteúdo total de fenóis (FE) e flavonoides (FLA) em brotos de feijão mungo-verde tratados com solução de ácido salicílico.....	56
Tabela 5 -	Comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), comprimento total (CT, cm), relação raiz/parte aérea em comprimento (R R/PA), massa seca de parte aérea (MSPA, g), massa seca de raiz (MSR, g) e massa seca total (MST, g) de brotos de feijão mungo-verde tratados com solução de ácido ascórbico.....	58
Tabela 6 -	Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (PRX), proteína solúvel (PROT), atividade antioxidante (AA), concentração inibitória (IC50) e conteúdo total de fenóis (FE) e flavonoides (FLA) em brotos de feijão mungo-verde tratados com solução de ácido ascórbico.....	62
Tabela 7 -	Comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), comprimento total (CT, cm), relação raiz/parte aérea em comprimento (R R/PA), massa seca de parte aérea (MSPA, g), massa seca de raiz (MSR, g) e massa seca total (MST, g) de	

	brotos de feijão mungo-verde tratados com solução de sacarose.....	65
Tabela 8 -	Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (PRX), proteína solúvel (PROT), atividade antioxidante (AA), concentração inibitória (IC50) e conteúdo total de fenóis (FE) e flavonoides (FLA) em brotos de feijão mungo-verde tratados com solução de sacarose.....	68
Tabela 9 -	Comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), comprimento total (CT, cm), relação raiz/parte aérea em comprimento (R R/PA), massa seca de parte aérea (MSPA, g), massa seca de raiz (MSR, g) e massa seca total (MST, g) de brotos de feijão mungo-verde tratados com solução salina.....	71
Tabela 10 -	Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (PRX), proteína solúvel (PROT), atividade antioxidante (AA), concentração inibitória (IC50) e conteúdo total de fenóis (FE) e flavonoides (FLA) em brotos de feijão mungo-verde tratados com solução salina.....	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Objetivo geral	20
1.2	Objetivos específicos	20
2	JUSTIFICATIVA	22
3	HIPÓTESE	23
4	REVISÃO DE LITERATURA	24
4.1	Aspectos da cultura Vigna radiata L.	24
4.2	Alimentos funcionais: estado da arte	25
4.3	Metabolismo secundário	27
4.3.1	Terpenos	29
4.3.2	Compostos fenólicos	29
4.3.3	Compostos nitrogenados.	32
4.4	Espécies ativas de oxigênio (EROs)	32
4.4.1	Superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	33
4.4.2	Radicais hidroxila (OH^{\bullet})	34
4.4.3	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	35
4.5	Elicitores	35
4.5.1	Ação dos elicitores na promoção do metabolismo secundário	36
4.5.2	Luminosidade	43
5	MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1	Ensaio com Ácido Salicílico	46
5.2	Ensaio com Ácido Ascórbico	46
5.3	Ensaio com Sacarose	46
5.4	Ensaio com Solução Salina	47
5.5	Bioquímica	47

5.6	Análise Estatística.....	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
6.1	Ácido Salicílico.....	52
6.2	Ácido Ascórbico.....	57
6.3	Sacarose.....	64
6.4	Solução salina	71
6.5	Análise dos índices.....	75
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
8	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

As implicações que a atividade física e a alimentação proporcionam à saúde tem sido tema de grande interesse da sociedade nas últimas décadas. Esse interesse está ligado a maior expectativa e qualidade de vida, propiciando a incorporação, na dieta humana, de alimentos saudáveis, livres de agrotóxicos, cultivados em sistemas naturais, essencialmente em razão da preocupação com a saúde e com o meio ambiente.

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), de mais de 50.000 espécies de plantas comestíveis no mundo, apenas algumas centenas são fontes alimentares importantes e nutritivas. Dentre estas centenas, os brotos e os microverdes desempenham papel importante na nutrição humana, pois são ricos em proteínas, vitaminas, minerais e fibras alimentares. Brotos são definidos como o produto obtido da germinação das sementes e seu desenvolvimento em água ou outro meio, colhido antes do desenvolvimento das folhas verdadeiras e que se destina a ser consumido inteiro, incluindo a semente (Di Gioia; Renna; Santamaria, 2017).

Os microverdes são definidos como verdes tenros, produzidos a partir de sementes de vegetais comestíveis e ervas, tendo duas folhas de cotilédone totalmente desenvolvidas com ou sem o surgimento de um par rudimentar de primeiras folhas verdadeiras (Yao *et al.*, 2012).

De acordo com Wojdyło *et al.* (2020), os brotos são melhores fontes de aminoácidos, pectinas e açúcares do que os microverdes. Microverdes foram caracterizados por alto teor de carotenóides e clorofilas e ácido orgânico, sem açúcares, exibindo maior atividade antidiabética e anticolinérgica do que brotos.

A obtenção de brotos comestíveis para consumo diário, por meio de processos simples de germinação, em curtos períodos, oferece melhores valores nutricionais e medicinais ao serem ingeridos. Compreender os principais compostos bioativos e bioatividade de sementes e brotos comestíveis germinados pode ser útil para sua melhor utilização como alimentos funcionais (Gan *et al.*, 2017).

A leguminosa (*Vigna radiata* L.) é consumida como alimento comum na China há mais de 2.000 anos. Nos últimos anos, estudos mostraram que os brotos de feijão mungo, após a germinação, têm atividades biológicas mais óbvias e metabólitos secundários mais abundantes, uma vez que enzimas biossintéticas relevantes são

ativadas durante os estágios iniciais da germinação (Tang *et al.*, 2014). Assim, acredita-se que a germinação melhore as qualidades nutricionais e medicinais do feijão mungo (El-Adawy *et al.*, 2003).

Neste cenário, a aplicação de elicitores, após a germinação, tais como ácido salicílico, ácido ascórbico, sacarose e salinidade podem melhorar o desempenho produtivo e a biossíntese de compostos secundários, estimulando as funções antioxidantes destes brotos, de forma a se recomendar o uso dos elicitores, no que tange a concentrações e formas de aplicação.

Visa dar continuidade aos estudos desenvolvidos por Duarte *et al.* (2023), onde percebeu-se que para brotos de feijão mungo-verde, todos os elicitores testados (ácidos salicílico (AS) e ascórbico (AC), assim como o tocoferol), propiciaram um estímulo às funções antioxidantes dos brotos. Levando-se em conta que para as concentrações mais elevadas, os parâmetros biométricos foram reduzidos, faz-se necessário estudos para se buscar a dosagem adequada ao processo, assim como a luminosidade adequada à produção (claro ou escuro).

1.1 Objetivo geral

Comparar os brotos de feijão mungo-verde (*Vigna radiata* L.), produzidos no claro e escuro e utilização de elicitores em diferentes doses, quanto aos parâmetros biométricos e investigar quanto à atividade antioxidante.

1.2 Objetivos específicos

Classificar biometricamente a produção de brotos produzidos com e sem a aplicação de elicitores, em ambiente controlado, com e sem o efeito da luz;

Obter brotos comestíveis com qualidades biométricas que propiciem sua inserção no mercado;

Avaliar a utilização de elicitores em diferentes concentrações, na geração de aumento de atividade antioxidante;

Validar a hipótese de que a aplicação dos elicitores propiciará um aumento de atividade antioxidante em brotos de feijão mungo-verde.

O experimento foi conduzido no laboratório de sementes da Unoeste, Presidente Prudente / SP. Para o estudo de cada elicitor foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado com arranjo fatorial dos tratamentos (doses dos elicitores x condição de luminosidade) com quatro repetições e análise de regressão polinomial testando-se ajuste linear ou quadrático.

2 JUSTIFICATIVA

Justifica-se, diante da necessidade de se testar outros elicitores, assim como dosagens. Serão verificados os efeitos advindos da aplicação exógena de AS, AC, sacarose e solução salina sobre *Vigna radiata* L.

3 HIPÓTESE

Este trabalho testou a hipótese de que a aplicação dos elicitores mencionados (aplicação exógena de AS, AC, sacarose e solução salina), possuem efeitos sobre vários processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento dos brotos. Testou-se a efetividades dos elicitores, analisando a concentração que propiciou aumento de atividade antioxidante em brotos de feijão mungo-verde, com ou sem luminosidade, sem que houvesse perda de qualidade comercial.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Aspectos da cultura *Vigna radiata* L.

O feijão-mungo-verde, *Vigna radiata* (L.), é uma leguminosa anual, de porte ereto/semi ereto, que pode utilizar o mesmo maquinário utilizado na cultura da soja, uma vez que a lavoura dessa cultura pode ser mecanizada, o que facilita toda a cadeia produtiva. É bastante rico em proteínas, vitamina B e ferro, e mesmo não sendo tão conhecido no Brasil, há um consumo bem frequente na forma de broto (Coutinho *et al.*, 2022).

O feijão mungo-verde é altamente adequado para a produção de brotos de vegetais, e seu uso é comum no Leste Asiático e no Sudeste Asiático. O broto de feijão-mungo fresco é uma guarnição comumente usada para sopas de macarrão em países como Tailândia, Laos e Vietnã. Na Coreia, os brotos são escaldados e usados como acompanhamento (chamado *sukju namul*) ou com feijão-mungo moído em panquecas recheadas (*bindaetteok*). Na Indonésia, os brotos de feijão-mungo, localmente conhecidos como *tauge*, são encontrados em vários pratos, como brotos de feijão-mungo fritos com tofu (*tauge goreng*) e brotos de feijão-mungo escaldados em uma salada vegetal servida com molho de amendoim (*gado-gado*), em sopa de frango (*soto ayam*) e refogado com vários vegetais e ovos (*orak-arik*) (Nair; Schreinemachers, 2020).

O segmento de germinação representa o segmento de alto valor do mercado, pois os grãos precisam atender a atributos de qualidade exigentes. Os consumidores preferem brotos que sejam brilhantes e crocantes, com raízes curtas e cotilédones pequenos e que tenham prazo de validade de pelo menos sete dias.

Há uma demanda crescente por broto de feijão-mungo em países de alta renda na Europa e na América do Norte, mas nesses continentes há padrões rígidos em relação aos resíduos de pesticidas nas sementes usadas para a produção de mudas, o que torna difícil para os países de baixa renda abastecer esses mercados. Há escassez de resultados confiáveis acerca da produção de mungo-verde.

O *Vigna radiata* L. (feijão mungo-verde) apresenta alto valor nutricional de seus brotos, cujo consumo tem sido relacionado a efeitos antioxidantes, antiinflamatórios, antidiabéticos, anti-hipertensivos e antitumorais (Guo; Ge; Jom, 2017; Amitrano *et al.*, 2018).

4.2 Alimentos funcionais: estado da arte

Os alimentos funcionais (FFs) foram definidos pela primeira vez na década de 1980, quando o Ministério da Saúde e Bem-Estar do Japão estabeleceu um sistema regulatório para alimentos que possuem possíveis benefícios à saúde (Konstantinidi; Koutelidakis, 2019).

Alimento funcional é um termo muito popular na mídia social e científica; conseqüentemente, os produtores de alimentos investiram recursos no desenvolvimento de alimentos processados que podem fornecer benefícios funcionais adicionais para o bem-estar dos consumidores. Devido à regulamentação intrínseca e aos propósitos de fim de uso em diferentes países, os significados e definições mundiais desse termo ainda são obscuros (Granato *et al.*, 2020).

De acordo com Kirina *et al.* (2020), o padrão GOST R 52349-2005 (russo), afirma que um “produto alimentar funcional” é “um produto alimentar especial destinado ao uso sistemático como parte de dietas alimentares por todas as faixas etárias de uma população saudável, que tem propriedades cientificamente justificadas e confirmadas, reduz o risco de desenvolver doenças relacionadas à nutrição, previne a deficiência ou supre a deficiência de nutrientes no corpo humano, preserva e melhora a saúde devido à presença de ingredientes alimentares fisiologicamente funcionais em sua composição”.

Os alimentos funcionais, ao contrário dos tradicionais, devem conter ingredientes que efetivamente aumentem as funções de algum órgão e do corpo humano como um todo (Babushkin *et al.*, 2015).

O mercado de alimentos funcionais (Estados Unidos, Japão, Ásia-Pacífico e União Europeia) é um nicho lucrativo da produção de alimentos e deve crescer globalmente com taxa de 8,5% ao ano (Bogue; Collins; Troy, 2017). No setor, houve um faturamento de 69 bilhões de euros em 2018 (Serrano *et al.*, 2022).

Alguns dos fatores promotores da saúde podem estar presentes em um nível dez vezes maior em brotos do que em vegetais maduros (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2008). Segundo Galati e O’Brien (2004), é o caso do teor de flavonoides e de outros compostos fenólicos que contribuem claramente para o potencial antioxidante.

As oportunidades de mercado para produtos alimentícios funcionais com alegações de saúde podem estar vinculadas à aceitação pelos consumidores, que depende de múltiplos fatores classificados em duas categorias principais: grupo de

características relacionadas ao consumidor e grupo de características relacionadas ao produto. Dentre vários fatores, a rotulagem, a motivação para a saúde e a atitude do consumidor em relação aos produtos alimentícios funcionais são os que mais influenciam as decisões de compra dos consumidores em relação a esses produtos.

Esses três fatores estão parcialmente interligados, pois consumidores que estão motivados e comprometidos em melhorar e / ou manter seu estado de saúde, estão mais interessados nas informações mostradas na rotulagem e mais propensos a ter uma atitude positiva em relação à compra de alimentos funcionais (Díaz; Fernández-Ruiz; Cámara, 2020). (Tabela 1). Ainda segundo o autor, quanto mais informações favoráveis um produto alimentar funcional apresentar, maior será o interesse do consumidor em adquirir este alimento.

Tabela 1 - Classificação geral dos fatores que afetam as preferências dos consumidores e a aceitação de produtos funcionais.

Preferências dos consumidores e aceitação de produtos alimentares funcionais	
Fatores	
Características relacionadas aos consumidores	
Pessoais	Idade; gênero; consciência de saúde; renda e educação
Psicológicas	Motivação para saúde; atitude de consumidor e benefícios e riscos
Culturais e Sociais	
Características relacionadas aos produtos	
	Preço; sabor; marca; recursos do pacote; rótulo

Fonte: Adaptado de Díaz, Fernández-Ruiz e Cámara (2020)

De acordo com Moraes (2006), uma grande variedade de produtos tem sido caracterizada como alimentos funcionais, incluindo componentes que podem afetar inúmeras funções corpóreas, relevantes tanto para o estado de bem-estar e saúde como para a redução do risco de doenças. Esta classe de compostos pertence à nutrição e não à farmacologia, merecendo uma categoria própria, que não inclua suplementos alimentares, mas o seu papel em relação às doenças estará, na maioria dos casos, concentrado mais na redução dos riscos do que na prevenção.

Os alimentos funcionais apresentam as seguintes características (Roberfroid, 2002):

a) devem ser alimentos convencionais e serem consumidos na dieta normal/usual;

b) devem ser compostos por componentes naturais, algumas vezes, em elevada concentração ou presentes em alimentos que normalmente não os supririam;

c) devem ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, promovendo benefícios à saúde além de aumentar a qualidade de vida, incluindo os desempenhos físico, psicológico e comportamental;

d) a alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico;

e) pode ser um alimento natural ou um alimento no qual um componente tenha sido removido;

f) pode ser um alimento onde a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada;

g) pode ser um alimento no qual a bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada.

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os Alimentos Funcionais através das seguintes resoluções: ANVISA/MS 16/99; ANVISA/MS 17/99 e ANVISA/MS 19/99.

4.3 Metabolismo secundário

O número estimado de espécies de plantas no mundo é de cerca de 500.000 (Mendelsohn; Balick, 1995). As plantas são compostas basicamente por carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucléicos, vitaminas e outros componentes celulares. Esses bioquímicos constituem a arquitetura básica da célula da planta e eles também regulam o metabolismo e o crescimento e desenvolvimento da planta. Coletivamente, possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia como, os aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, são chamados de metabólitos primários (Wu; Chappell, 2008).

Na natureza, uma variedade de vias de metabolismo secundário eliciu uma variedade de compostos defensivos de plantas chamados metabólitos secundários (Taiz, 2017).

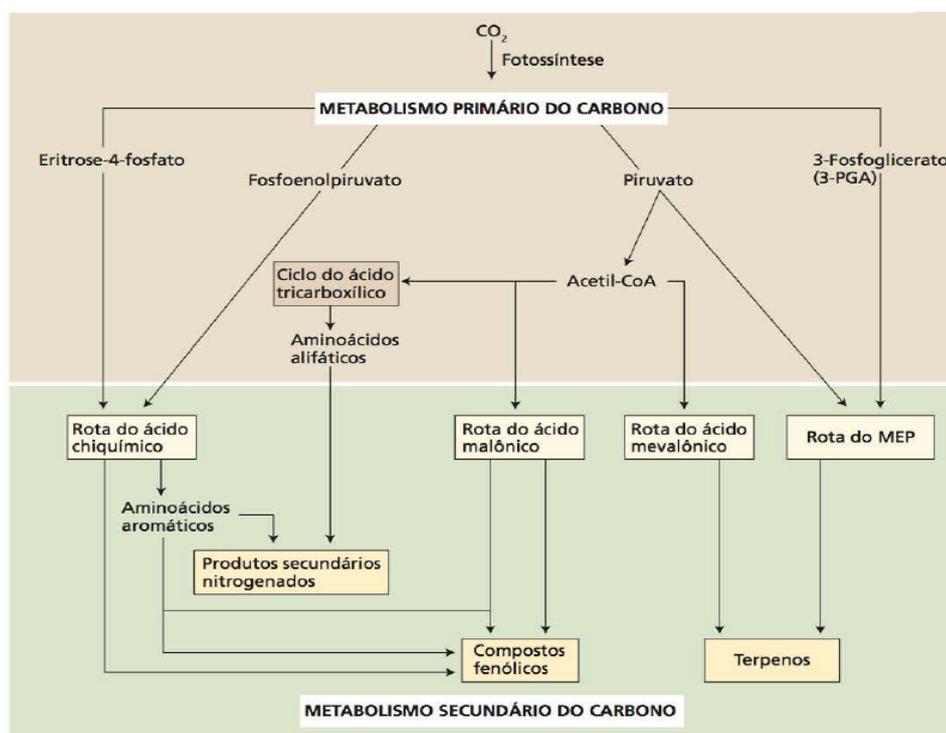
Os metabólitos secundários das plantas desempenham papéis importantes na sobrevivência das plantas e na criação de conexões ecológicas entre outras espécies. Além de fornecer uma variedade de produtos naturais valiosos, os metabólitos secundários ajudam a proteger as plantas contra ataques patogênicos e estresses ambientais. Na verdade, os metabólitos secundários atuam como dissuasores de herbívoros, barreiras contra a invasão de patógenos e mitigadores do estresse

oxidativo. O acúmulo de metabólitos secundários é altamente dependente de fatores ambientais como luz, temperatura, água do solo, fertilidade do solo e salinidade (Jan *et al.*, 2021).

Os metabólitos secundários se diferem dos metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e acil-lipídeos), por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal; isto é, metabólitos secundários específicos são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas (enquanto os metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal), e não tem participação direta no metabolismo essencial para a sobrevivência da planta (Taiz, 2017).

Os metabólitos secundários das plantas são geralmente classificados de acordo com sua estrutura química (Harborne, 1999). São três as principais classes de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Taiz, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Visão simplificada das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.



Fonte: Taiz (2017)

4.3.1 Terpenos

Os terpenos, ou terpenoides, constituem a maior classe de metabólitos secundários. A maioria das diversas substâncias desta classe é, em geral, insolúvel em água. Os terpenos são sintetizados a partir de acetil-CoA ou de seus intermediários glicolíticos (Taiz, 2017).

Terpenos são os compostos majoritários de óleos essenciais. Com ampla utilização, principalmente na perfumaria e cosméticos, tais substâncias encontram também significativa aplicabilidade na indústria alimentícia por contribuir no reforço ou na melhora da qualidade sensorial dos alimentos (Ravindra; Kulkarni, 2015).

4.3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que desempenham diversas funções nas plantas e o consumo regular de produtos ricos nestes compostos tem sido associado à redução dos riscos de câncer, obesidade, doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas (Ahmad *et al.*, 2016; Boeing *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos são sintetizados pelas plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de estresse, e os compostos ocorrem de forma generalizada nas plantas como o grupo diversificado de fitoquímicos derivados da fenilalanina e da tirosina (Chon, 2013).

São substâncias amplamente distribuídas na natureza, mais de dez mil compostos fenólicos já foram detectados em plantas (Taiz, 2017). Esse grande e complexo grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995).

Os flavonoides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma

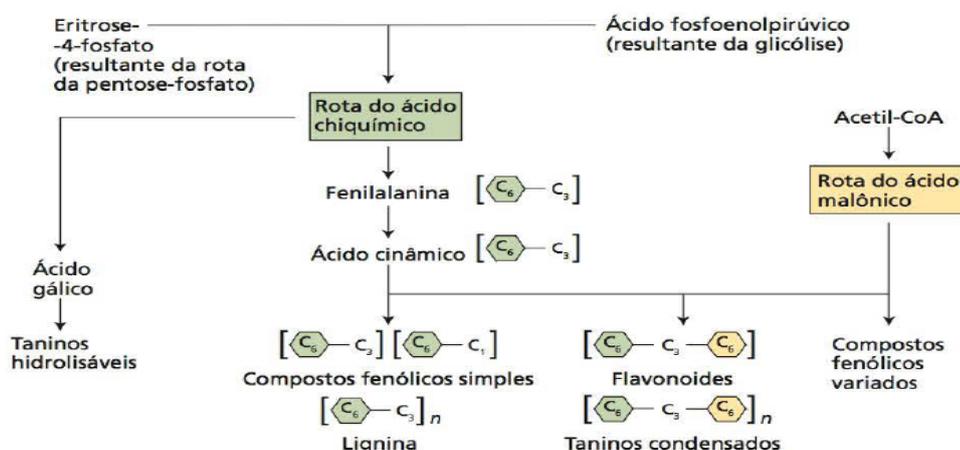
série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre os sistemas biológicos, por exemplo, como antioxidantes (Lopes *et al.*, 2003).

O potencial antioxidante de um composto é determinado pela reatividade dele como um doador de elétrons ou hidrogênio, capacidade de deslocar ou estabilizar um elétron desemparelhado, reatividade com outro antioxidante e reatividade com oxigênio molecular. Outros efeitos fisiológicos da ação de compostos antioxidantes seriam sua atuação como anticancerígenos e antimutagênicos sempre considerando que estes problemas ocorram por ação de radicais livres (Moraes, 2006).

A formação de radicais livres está associada com o metabolismo normal de células aeróbicas. O consumo de oxigênio inerente à multiplicação celular leva a geração de uma série de radicais livres. A interação destas espécies com moléculas de natureza lipídica em excesso produz novos radicais: hidroperóxidos e diferentes peróxidos. Estes grupos de radicais podem interagir com os sistemas biológicos de formas citotóxicas. Com respeito a isto, flavonoides e fenóis têm sido reportados por possuírem atividade antioxidante contra os radicais livres, a qual está associada às propriedades redox dos grupos hidroxila e a sua relação com diferentes partes da estrutura química (Benavente-García *et al.*, 1999).

Taiz (2017), afirmam que os compostos fenólicos são sintetizados por diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (Figura 2).

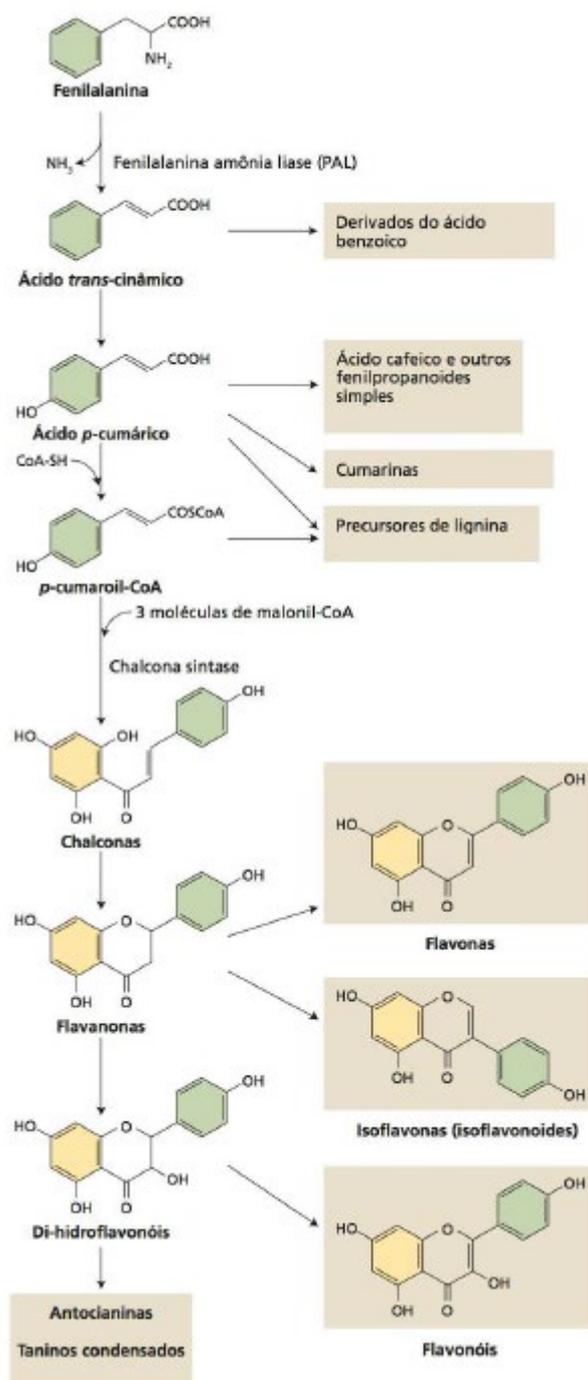
Figura 2 - Rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico.



Fonte: Taiz (2017)

As classes mais abundantes de compostos fenólicos em plantas são derivadas da fenilalanina, pela eliminação de uma molécula de amônia, formando o ácido cinâmico (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina.



Fonte: Taiz (2017)

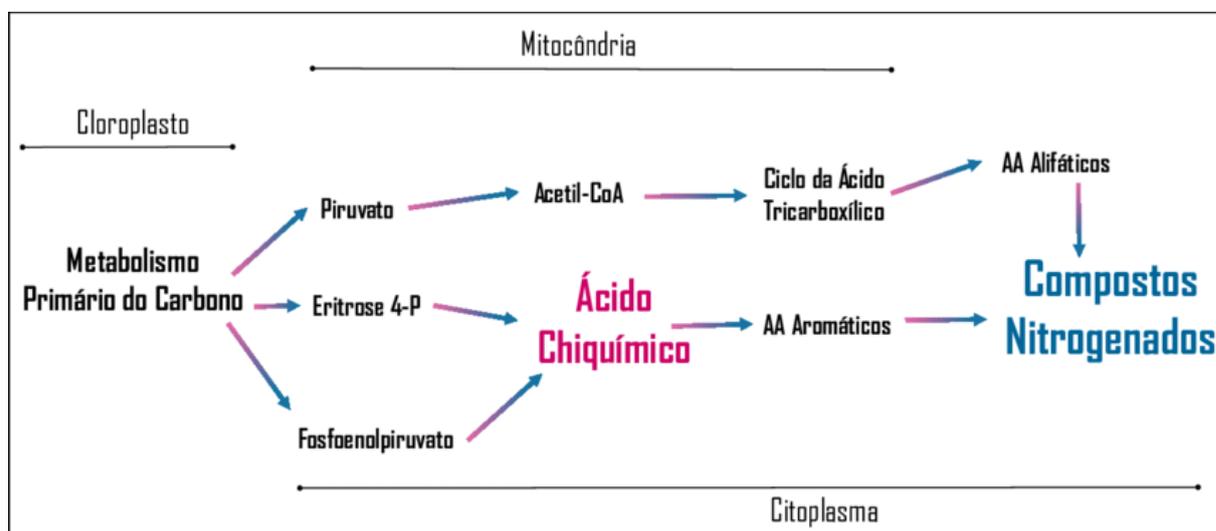
4.3.3 Compostos nitrogenados

Compostos nitrogenados são defesas químicas contra herbivoria. As três classes mais importantes dos compostos nitrogenados são: alcaloides; glucosinolatos; glicosídeos cianogênicos. Essas substâncias são formadas a partir de aminoácidos aromáticos e alifáticos.

No grupo dos compostos nitrogenados incluem os alcaloides, glicosídeos cianogênicos e aminoácidos não proteicos. Os alcaloides são os principais compostos nitrogenados e são encontrados em aproximadamente 20% das espécies de plantas vasculares, mais frequentes em dicotiledôneas herbáceas e em poucas monocotiledôneas e gimnospermas (Pagare *et al.*, 2015).

Os compostos nitrogenados são derivados do ciclo do ácido tricarboxílico e do ácido chiquímico. Na rota do ácido tricarboxílico forma-se aminoácidos alifáticos que dão origem aos produtos secundários nitrogenados. Na rota do ácido chiquímico são formados os aminoácidos aromáticos que, por fim também originam os compostos nitrogenados (Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma simplificado da rota de ácido chiquímico.



Fonte: Adaptado de Taiz (2017).

4.4 Espécies ativas de oxigênio (EROs)

Barbosa *et al.* (2014) afirmaram que os processos metabólicos dependentes do oxigênio, como a respiração aeróbica, fotossíntese e fotorrespiração, levam à produção de EROs em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, respectivamente.

O oxigênio molecular presente nas células é relativamente não reativo e não tóxico, em função da estrutura estável de seus elétrons em sua camada externa. Entretanto, o O_2 leva, inevitavelmente, à formação de espécies reativas de oxigênio, em eventos metabólicos que ocorrem, principalmente, nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Bhattacharjee, 2010; Karuppanapandian *et al.*, 2011). Essas reações podem dar origem à $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e OH^{\cdot} .

O sistema celular de defesa antioxidante começa com uma cascata enzimática, mas envolve também componentes não enzimáticos, dentre os quais se destacam o ascorbato (AsA), a glutathiona (GSH), o β -caroteno e o α -tocoferol. Tais antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestrá-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (Serkedjieva, 2011).

Sharma *et al.* (2012), descreve que a ativação do O_2 ocorre por dois mecanismos diferentes. A redução monovalente escalonada de O_2 leva à formação de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $\cdot OH$, enquanto a transferência de energia para O_2 leva à formação de $O_2 \cdot O_2^{\cdot-}$ sendo facilmente dismutada em H_2O_2 não enzimaticamente ou por reação catalisada por superóxido dismutase (SOD) para H_2O_2 . A molécula de H_2O_2 é convertido em H_2O pela catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX) e ascorbato peroxidase (APX).

As EROs são produzidas em células não estressadas e estressadas em vários locais nos cloroplastos, mitocôndrias, membranas plasmáticas, peroxissomos, apoplasto, retículo endoplasmático e paredes celulares. As EROs são sempre formadas pelo inevitável vazamento de elétrons para o O_2 das atividades de transporte de elétrons de cloroplastos, mitocôndrias e membranas plasmáticas ou como um subproduto de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (Sharma *et al.*, 2012).

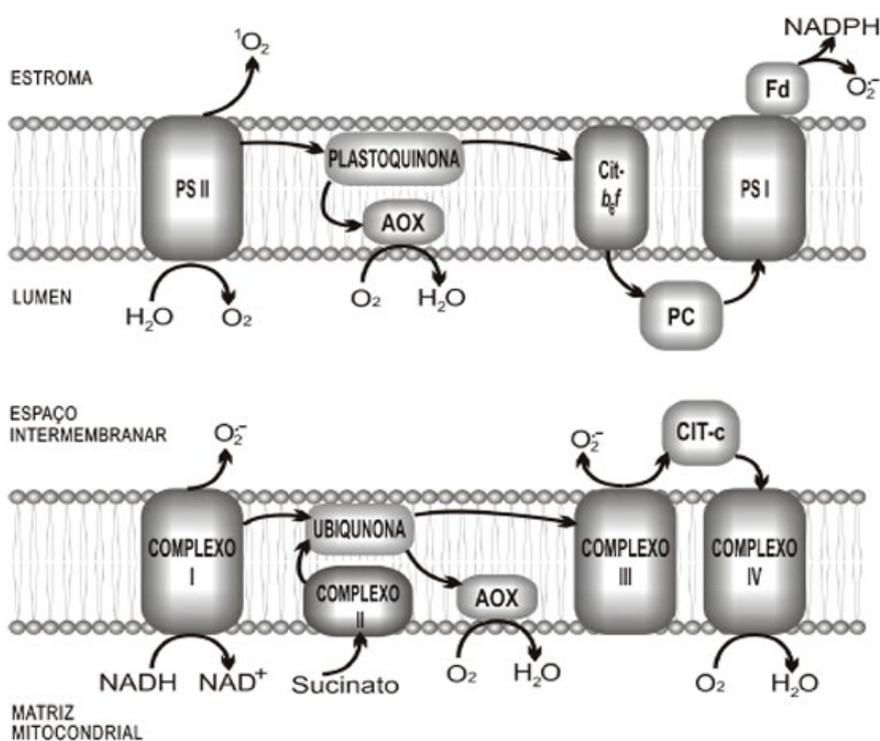
4.4.1 Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

As espécies reativas de oxigênio causam uma cascata de reações oxidativas resultando no descoramento (“*bleaching*”) da clorofila e destruição de membranas, pois são produzidos pela NADPH oxidase (Shaaltiel; Gressel, 1986). Pode ser produzido na planta por meio de vários mecanismos, inclusive pela ativação de NADPH-oxidases/sintases ligadas à membrana, peroxidases (POX) da parede

celular, lipoxigenases (LOX) e como resultado da transferência de elétrons da mitocôndria ou do cloroplasto (Resende *et al.*, 2003) (Figura 5).

O superóxido é um de uma série de espécies ativas de oxigênio que podem ser muito prejudiciais a membranas biológicas, mas, quando produzidos desta forma, são passíveis de eliminação pela ação de uma série de enzimas, incluindo superóxido dismutase e ascorbato peroxidase (Asada, 1999).

Figura 5 - Formação do $O_2^{\cdot-}$ em cadeias de transporte de elétrons (a) na fotossíntese ocorre no PS-I; (b) na respiração nos complexos I e III.



Fonte: Barbosa *et al.* (2014)

4.4.2 Radicais hidroxila (OH^{\cdot})

Os radicais hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) que são formados a partir do $O_2^{\cdot-}$ por protonação em soluções aquosas podem atravessar as membranas biológicas e subtrair átomos de hidrogênio de ácidos graxos poli-insaturados e hidroperóxidos de lipídeos, iniciando então, a auto oxidação de lipídeos.

O radical hidroxila (OH^{\cdot}) é a mais reativa das EROs, sendo formado a partir de $O_2^{\cdot-}$ ou H_2O_2 na reação de Haber-Weiss. O radical OH^{\cdot} pode reagir potencialmente com todas as moléculas biológicas como DNA, proteínas, lipídeos e praticamente qualquer componente celular. Como as células não possuem mecanismos

enzimáticos para eliminar essa espécie altamente reativa, seu acúmulo pode levar à morte celular.

4.4.3 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O H₂O₂ é uma EROs moderadamente reativa com uma meia-vida relativamente longa (1 ms) e cujo pequeno tamanho permite-lhe atravessar membranas celulares e migrar em compartimentos diferentes e são produzidos pela NADPH oxidase. Dessa forma, difunde os danos e atua como um mensageiro da condição de estresse. O H₂O₂ tem uma ação deletéria, porque participa da reação formadora de OH•, o oxidante mais reativo na família das EROs. Além disso, o H₂O₂ é capaz de inativar enzimas por oxidação de seus grupos tiol (Gadjev *et al.*, 2008; Karuppanapandian *et al.*, 2011).

4.5 Elicitores

A elicitação é uma abordagem biotecnológica para melhorar o conteúdo de compostos fenólicos e as propriedades antioxidantes de alimentos funcionais prontos para consumo (Gómez-Velázquez; Aparicio-Fernández; Reynoso-Camacho, 2021).

Elicitores são substâncias que se definem por sua capacidade de, ao serem adicionadas em pequenas doses em células vivas, poderem iniciar ou melhorar a síntese de compostos químicos específicos (Edreva *et al.*, 2008; Ferrari, 2010).

Os elicitores podem ser classificados de duas maneiras. No primeiro caso, quanto a sua origem: exógenos, quando gerados fora das plantas e endógenos, quando gerados dentro das plantas podendo ser íons metálicos e compostos inorgânicos ou orgânicos. No segundo caso, quanto a sua natureza: bióticos (derivados de fonte vegetal, microbiana e constituintes herbívoros), ou abióticos (agentes físicos e químicos). O metabolismo secundário gera produtos que são hoje em dia essenciais tanto para a indústria farmacêutica quanto para a nutrição humana. Quando os organismos vegetais recebem os elicitores, as células podem aumentar o rendimento na produção de metabólitos específicos via metabolismo secundário, gerando uma melhora na qualidade e quantidade de compostos (Namdeo, 2007).

De conformidade com Bhaskar *et al.* (2022), recentemente, uma nova estratégia para aumentar a produção de metabólitos em plantas tem sido empregada

com o uso de elicitores. Esses elicitores são as substâncias químicas que acionam as vias biossintéticas, ativando certos fatores de transcrição e regulando positivamente os genes. Assim, a produção de metabólitos secundários aumenta no sistema vegetal devido ao estresse desenvolvido pela introdução dos elicitores.

Duarte *et al.* (2023), após tratamento de brotos de feijão mungo verde (*Vigna radiata* L.), com ácido salicílico (AS), tocoferol (TOC) e ácido ascórbico (AC), verificaram que todos os elicitores estimularam as funções antioxidantes dos brotos e, nas maiores concentrações, reduziram os parâmetros biométricos; assim, concentrações mais baixas foram mais eficientes. Pela primeira vez, foi alcançado um equilíbrio entre a concentração do elicitor e a aplicação em parcelas para incrementar a produção de brotos e aprimorar características nutricionais aprimoradas.

4.5.1 Ação dos elicitores na promoção do metabolismo secundário

A produção de metabólitos secundários está ligada à diferenciação da planta e significa que as vias secundárias são ativadas na planta como um todo (Alcade *et al.*, 2022).

O mecanismo de ação é baseado na interação elicitor-receptor que leva a uma cascata de eventos bioquímicos. Embora todos os elicitores comecem com a interação do receptor na membrana plasmática, dentro da célula, os elicitores desencadeiam várias vias que alteram processos bioquímicos e fisiológicos e isso leva à produção de diferentes metabólitos secundários ou compostos responsivos de defesa (Ferrari 2010; Shasmita *et al.*, 2018).

Segundo Shabala e Pottosin (2014), a interação elicitor-receptor leva à alteração de íons presentes através da membrana celular, como o influxo de íons de cálcio (Ca^{2+}) e efluxo do cátion (K^+) e ânions (Cl^-).

Como resposta às variações ambientais ou sinais de patógenos, nas plantas, o cálcio atua como mensageiro secundário, sendo que os canais de cálcio são ativados em poucos minutos após a adição do elicitor ao sistema. Este fluxo iônico leva à acidificação citoplasmática e aumenta o pH extracelular levando à despolarização da membrana plasmática (Mathieu *et al.*, 1996; Sakano, 2001; Zhao *et al.*, 2005).

4.5.1.1 Ácido Salicílico (AS)

O ácido salicílico (AS) é um importante hormônio vegetal de natureza fenólica, que é mais conhecido por mediar as respostas do hospedeiro à infecção por patógenos. Seu papel na ativação da defesa vegetal está bem estabelecido, mas sua biossíntese em plantas não é totalmente compreendida (Lefevre; Bauters; Gheysen, 2020). É formado por compostos fenólicos e sintetizado a partir do aminoácido fenilalanina. Seu efeito elicitor significa que, em pequenas quantidades, o AS pode funcionar como promotor de crescimento, antioxidante e ainda aumentar a lignificação dos vegetais, por estimular o metabolismo secundário.

O AS atua como principal ativador de sinais secundários que ativa enzimas antioxidantes, ou seja, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) (Khan *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011). De acordo com estudos de Khan *et al.* (2010), a ativação do gene SOD é a etapa principal na desintoxicação de EROs, que desloca íons superóxido em H_2O_2 e O_2 . Além disso, a deposição de peróxido de hidrogênio é inibida por CAT enquanto; a peroxidase converteu-o em molécula de água. Abbas *et al.* (2013) afirmaram que mudas possuem o nível elevado de atividade das enzimas antioxidantes podendo resistir melhor ao dano oxidativo, ativado por EROs.

O AS, quando aplicado exogenamente, pode desencadear sistemicamente a expressão de um conjunto de genes de defesa que naturalmente são ativados quando ocorre infecção por patógeno, de modo a estimular a síntese de vários metabólitos vegetais, como os polifenóis e compostos nitrogenados (Okada *et al.*, 2007).

Pacheco *et al.* (2007) avaliaram a germinação de sementes de camomila e calêndula em diferentes concentrações de AS. Assim, constataram que concentrações acima de 0,2 mM prejudicam a germinação das sementes de camomila, enquanto dosagens de 0,025 mM e 0,05 mM favoreceram a germinação e a velocidade dela em calêndula.

Duarte *et al.* (2023), verificaram quanto aos parâmetros biométricos de crescimento (produção de biomassa aérea e radicular), que a aplicação exógena de AS na dose de 230 mg L⁻¹ não apresentou efeito negativo sobre os parâmetros de crescimento, assim como incrementou o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos brotos de feijão mungo-verde tratados.

Existem ainda pesquisas que buscaram estabelecer relação entre a aplicação de AS com antioxidantes enzimáticos. Para Silva *et al.* (2016), a presença de peroxidase em maracujazeiro amarelo aumentou significativamente nos intervalos de 12 e 24h de aplicação. Na aplicação via foliar, em duas espécies híbridas de girassol, a presença de superóxido dismutase e peroxidase aumentou significativamente, enquanto a enzima catalase se manteve sem alterações (Noreen; Ashraf, 2009).

Golkar, Taghizadeh e Yousefian (2019), avaliaram doses entre 50 e 100 mg L⁻¹ de AS na produção de metabólitos secundários e na atividade antioxidante de calos de cártamo sob estresse salino.

O efeito de diferentes concentrações de ácido salicílico (SA) (0,25; 0,5 e 0,75 mg L⁻¹) e nanopartículas de prata (Ag NPs) (15, 30, 45 e 60 mg L⁻¹) no crescimento de calos, bem como a possibilidade de produção de glicosídeos de estévia em cultura de calos foi avaliada, sendo que a elicitação de AS, na concentração de 0,75 mg L⁻¹, resultou no maior nível de taxa de crescimento de calo (0,1 cm dia⁻¹), diâmetro de calo (0,79 cm) e peso fresco relativo de calo (0,085) (Golkar; Moradi; Garousi, 2019).

O ácido salicílico (AS) é uma molécula sinalizadora proeminente em plantas e está envolvida na resposta a estresses ambientais. Neste estudo, o possível papel do SA em aliviar a toxicidade do arsênico foi investigado em feijão mungo. As sementes após o tratamento com AS (0; 0,25; 0,5 e 1 mM) foram semeadas em vasos e expostas ao estresse de AS (0 ou 50 mg kg⁻¹ de solo) (Sadeghipour e Monem, 2021).

Pandey; Lal (2018), estudaram o efeito do ácido salicílico sob condição de estresse salino sobre o feijão-mungo. Esta pesquisa baseou-se no fato de o estresse salino afetar negativamente a fotossíntese, causando acúmulo excessivo de Na⁺ e Cl⁻ foliar, fechamento estomático e estresse oxidativo resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A aplicação exógena de ácido salicílico ocorreu para minimizar os teores de Na⁺, Cl⁻ e EROs no estresse salino. Neste estudo, usaram as seguintes concentrações de ácido salicílico (0,5; 1,0 e 1,5 mM), onde a concentração de ácido salicílico (0,5 mM) apresentou melhor resultado em todos os parâmetros de crescimento e rendimento.

4.5.1.2 Ácido Ascórbico (AC)

O estudo sistemático da relação entre a dieta e o escorbuto (doença causada por grave deficiência de vitamina C na dieta), só foi iniciado em 1747, por James Lind, um médico da esquadra naval britânica (Fiorucci; Soares; Cavalheiro, 2003).

James Lind, em 1747, documentou a ingestão de sucos cítricos no tratamento do escorbuto, realizando o primeiro estudo controlado de que se tem notícia na Medicina. Comparou grupos de tratamento e comprovou que o grupo que recebeu duas laranjas e um limão por dia melhorou drasticamente da doença em uma semana. Os resultados de sua experiência foram publicados em 1753. Em 1795 tornou-se obrigatória, na Marinha Britânica, a ingestão diária de sumos de frutas cítricas (Manela-Azulay *et al.*, 2003).

Muitas tentativas fracassaram de se tentar isolar e identificar a vitamina C em sua forma pura. Em 1928, o médico e bioquímico húngaro Albert Szent-Gyorgyi conseguiu isolar esta vitamina, que recebeu o nome de ácido hexurônico. Ele descobriu ainda que sua fórmula era $C_6H_8O_6$. Em 1932, o isolamento da vitamina C em forma cristalina pura foi conseguido por Szent-Gyorgyi e seu colaborador Norman Haworth, professor de Química na Universidade de Birmingham. A estrutura química foi identificada, e o produto, sintetizado sob a forma fisiologicamente ativa pouco depois; em 1938, o ácido ascórbico foi oficialmente aceito como nome químico da vitamina C (Le Couteur; Burreson, 2006).

Com relação à nomenclatura L-treo-2-hexenona-1,4-lactona ou vitamina C, houve uma modificação, em 1965, para o nome ácido L-ascórbico pela comissão de nomenclatura bioquímica da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Assim, o nome ácido ascórbico indicava a atividade antiescorbútica da vitamina C com origem na antiga forma inglesa da palavra escorbuto (scorby) (Rosa *et al.*, 2007).

O ácido ascórbico (vitamina C) é um dos mais importantes antioxidantes solúveis em água nas plantas, atuando como um modulador do desenvolvimento da planta através da sinalização hormonal e como coenzima em reações por meio das quais os carboidratos, gorduras e proteínas são metabolizados (Pastori *et al.*, 2003)

O AC é um dos mais importantes antioxidantes não enzimáticos e pode inativar várias EROs. Juntamente com a glutatona (GSH), participa do Ciclo do Ascorbato-Glutatona, no qual o H_2O_2 é eliminado pela ascorbato peroxidase (APX) mediante a peroxidação do AC. A recuperação do AC ocorre por meio da oxidação da GSH que torna a ser reduzida pela glutatona redutase (Dinakar *et al.*, 2012).

O ácido ascórbico é um metabólito multifuncional com fortes propriedades redutoras que permite a neutralização de EROs e a redução de moléculas oxidadas por EROs em cooperação com a glutatona no ciclo Foyer-Halliwell-Asada (Bilska *et al.*, 2019).

O pré-tratamento das sementes com antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, aumenta o vigor, e com isso, o potencial de armazenamento dessas sementes em condições adversas de temperatura e umidade (Maity *et al.*, 2007). É sugerido que o tratamento prévio das sementes com antioxidantes como o ácido ascórbico aumenta o vigor e prolonga a armazenabilidade das sementes, devido, principalmente, à remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Smirnov, 2000).

4.5.1.3 Sacarose

Estudos relataram que o tratamento com sacarose melhora o valor nutricional e a qualidade dos brócolis e da *Arabidopsis* (Solfanelli *et al.*, 2006). Como exemplo, o tratamento com sacarose aumentou o acúmulo de ácido ascórbico nos floretes de brócolis colhidos e a biossíntese de antocianinas em *Arabidopsis*.

Guo, Yuan e Wang (2011), avaliaram o efeito do manitol e sacarose no acúmulo de compostos promotores de saúde em brotos de brócolis e relataram que a sacarose aumentou a produção de sulforafano, ácido ascórbico e antocianinas.

De acordo com Jeong *et al.* (2018), o tratamento com sacarose leva ao aumento de compostos funcionais como vitaminas, flavonóides e atividade antioxidante de brotos de trigo sarraceno germinados. Ainda de acordo com os autores, o crescimento de brotos de trigo sarraceno foi significativamente afetado pelo tratamento com sacarose, além de observarem reduções no peso e altura dos brotos de trigo sarraceno, dependendo das concentrações de sacarose.

No experimento conduzido por Wei *et al.* (2019), as sementes de feijão mungo foram embebidas em $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de solução de sacarose por 24 horas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e pulverizadas com essa solução a cada 12 horas durante a germinação por 5 dias, desta forma, verificaram que o tratamento exógeno de sacarose aumentou o conteúdo de vitamina C e fenólicos totais e aumentou a atividade antioxidante em brotos de feijão mungo. Isso sugere que o tratamento exógeno de sacarose poderia ser uma técnica eficaz para produzir brotos de feijão mungo com mais vitamina C e maior capacidade antioxidante.

Durante a germinação e brotação do feijão mungo, os açúcares solúveis se acumulam nos brotos de feijão mungo ativando o metabolismo do açúcar, o que resulta em um aumento de metabólitos secundários, como ácido ascórbico e fenólicos (Chen *et al.*, 2019).

A sacarose desempenha um papel particularmente importante, pois é a principal forma de açúcares transcolados nas plantas; é também o açúcar usado com mais frequência em estudos de respostas de açúcares de plantas na regulação e desenvolvimento de genes. A aplicação de sacarose exógena resulta no acúmulo de ácido ascórbico (também chamado de vitamina C) em floretes de brócolis colhidos por meio da regulação positiva da expressão gênica relacionada ao metabolismo do ácido ascórbico (Nishikawa *et al.*, 2005).

Jeong *et al.* (2018), avaliaram os efeitos da sacarose (1%, 2% e 3%), na composição nutricional e funcional, bem como as atividades antioxidantes em brotos de trigo sarraceno durante a germinação. Os autores afirmam que o uso de sacarose como elicitador abiótico é barato e relativamente fácil de empregar na indústria.

4.5.1.4 Solução Salina (Indução de eustresse)

Estresses positivos (eustresses), são vários motivos estressantes físicos, biológicos ou químicos que ativam as vias de sinalização direcionando para um maior teor de ingredientes bioativos e características de qualidade das hortaliças (Ghoname *et al.*, 2019). Ainda de acordo com os autores, a salinidade pode ser uma ferramenta benéfica para uma melhoria integrada da qualidade de diferentes hortaliças para o gerenciamento de antioxidantes e conteúdos de ingredientes bioativos e para aumentar os impactos benéficos à saúde de produtos vegetais frescos.

A salinização do solo e da água é problema crescente sem fim, intensificado pelo uso irracional de fertilizantes e agroquímicos, consequente infiltração da água do mar em aquíferos frescos e intensificação das culturas em geral (Libutti; Monteleone, 2017).

Há estudos que devem ser considerados para transformar o problema de salinidade do solo em uma oportunidade para aumentar a qualidade dos vegetais com melhor conteúdo de compostos bioativos. Muitos destes, relataram o efeito das condições de cultivo e da concentração de salinidade na qualidade das culturas

vegetais, com foco especial nos metabólitos secundários e suas propriedades bioativas (Petropoulos *et al.*, 2017; Kyriacou; Rouphael, 2018).

Há que se considerar ainda que o ciclo da germinação é curto e que a semente utilizará suas próprias reservas, minimizando efeitos negativos referentes à salinidade.

Estudos demonstraram que sistemas sem solo podem facilitar a aplicação precisa de um eustresse (estresse positivo), como salinidade moderada ou estresse nutricional, por meio do gerenciamento preciso da concentração e composição (proporções catiônicas e aniônicas ou íons individuais) da solução nutritiva e, portanto, pode constituir um meios práticos e eficazes para melhorar o valor nutricional dos vegetais e para reduzir o acúmulo de compostos antinutrientes, como nitratos (Colla *et al.*, 2018; Rouphael; Kyriacou, 2018; Rouphael *et al.*, 2018a; 2018b).

Foi relatado que a salinidade aumenta significativamente os ingredientes bioativos de muitas frutas e hortaliças e pode ser considerada método inteligente para esse objetivo. Cardeñosa *et al.* (2015) informaram que o estresse por salinidade aumentou a atividade antioxidante e induziu a produção total de fenóis dos frutos de morango. Marín *et al.* (2009), revelaram que o aumento da salinidade da solução nutritiva até 30 mM causou aumento no teor de vitamina C em frutos de pimenta vermelha. Giuffrida *et al.* (2014), verificaram efeitos positivos da salinidade no teor total de fenóis e carotenóides de frutos de pimenta.

Na verdade, um estresse nutricional leve a moderado ou estresse salino (eustresse) pode propiciar respostas de defesa da planta induzindo a síntese e acúmulo de compostos bioativos, em particular aqueles capazes de desintoxicar EROs.

De acordo com Carillo *et al.* (2021), um leve estresse de salinidade (eustresse) pode modular a indução do sistema de defesa da planta em plantações de horticultura e a síntese de componentes fitoquímicos capazes de aumentar a resiliência da planta, o desempenho pós-colheita e a qualidade nutracêutica do produto. No entanto, a escolha do tipo de eustresse correto e da dose para induzir a síntese desses fitoquímicos protetores é fundamental para evitar a potencial interferência com o crescimento e a produtividade da planta.

Rossato *et al.* (2017), avaliaram a expressão gênica e a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e GR) e identificaram suas funções no controle dos níveis de EROs em plantas de arroz, cultivar BRS AG, após um período de estresse

salino. As plantas foram cultivadas *in vitro* com duas concentrações de NaCl (0 e 136 mM), coletadas aos 10, 15 e 20 dias de cultivo.

Pérez-Labrada *et al.* (2019), tiveram como objetivo de sua pesquisa, quantificar as respostas agronômicas e bioquímicas de tomateiros desenvolvidos sob estresse salino com a aplicação foliar de nanopartículas de cobre. Quatro tratamentos foram avaliados: aplicação foliar de nanopartículas de cobre (250 mg L^{-1}) com ou sem estresse salino (NaCl 50 mM), estresse salino e um controle absoluto. Com relação ao estresse salino, observaram que ocasionou graves danos ao desenvolvimento do tomateiro. O estresse salino causou graves danos ao desenvolvimento do tomateiro.

4.5.2 Luminosidade

De acordo com Taiz (2017), as sementes normalmente germinam no solo em ausência de luz e seus pró-plastídeos desenvolvem-se em cloroplastos somente quando a parte aérea jovem é exposta à luminosidade. Por outro lado, se as plântulas são mantidas no escuro, os pró-plastídeos diferenciam-se em estioloplastos, os quais apresentam arranjos semicristalinos tubulares de membranas, conhecidos como corpos pró-lamelares. Em vez de clorofila, os estioloplastos contêm um pigmento precursor, de cor verde-amarelada, a protoclorofilida.

Segundo Oliveira *et al.* (2020), um estudo com manjeriço foi instalado para avaliar o crescimento e sua produção sob diferentes níveis de luminosidade e reposição hídrica e verificaram que quando houve 50% de sombreamento e 100% de reposição de água, perdida pela evapotranspiração da cultura, resultaram em maiores valores de altura da planta, diâmetro do colmo, crescimento do ramo, massa fresca e seca de folhas e número de folhas. O ambiente de sol pleno e 100% de reposição de água proporcionaram aumento na massa seca e no volume da raiz.

Theparod e Harnsoongnoen (2022), examinaram os efeitos de diferentes comprimentos de onda de luz em brotos de girassol (*Helianthus annuus*) que foram estimulados durante a noite. O experimento examinou a germinação das sementes por sete dias. Os resultados mostraram que a luz vermelha teve a maior influência na germinação das sementes de girassol, enquanto a luz natural teve a maior influência no aumento dos comprimentos da raiz e do hipocótilo.

Muitos fatores, como o tempo de germinação e os tipos de luz, influenciam os processos fisiológicos e as vias biossintéticas nos brotos. Foi avaliado o efeito das

condições de luz vermelha, azul e branca vs. escura nos parâmetros de qualidade em diferentes espécies de brotos após 5 dias de germinação. Ascorbato total, proteínas solúveis, açúcares, compostos fenólicos e pigmentos, como carotenoides, clorofilas e antocianinas, foram investigados em rabanetes, soja, feijão-mungo e brotos de abóbora. Os tratamentos de luz aumentaram os conteúdos de vitamina C e os vários pigmentos em todos os brotos, inversamente, aumentaram as proteínas e açúcares solúveis, incluindo d-glicose, d-frutose e sacarose, na soja e abóboras, respectivamente. O tratamento escuro impediu a diminuição da matéria seca devido à iluminação, enquanto a luz vermelha induziu um aumento de polifenóis na soja. Esses resultados sugerem que o conteúdo nutricional de diferentes brotos cultivados sob diferentes condições de luz depende do comprimento de onda espectral escuro ou específico usado para seu crescimento (Mastropasqua; Dipierro; Paciolla, 2020)

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sementes da Faculdade de Agronomia da Unoeste, em Presidente Prudente/SP. As sementes de *Vigna radiata* L. foram obtidas de produtores, pois não havia empresa de sementes com sementes disponíveis no comércio nacional. Após a caracterização inicial do lote de sementes, com avaliações iniciais de germinação e teor de água (Brasil, 2009), foram instalados os experimentos com os elicitores.

Inicialmente as sementes foram submetidas a um processo de desinfecção de acordo com o método de Baenas *et al.* (2014). As sementes de feijão mungo-verde foram primeiramente imersas em solução de hipoclorito de sódio a 3% (v/v) por 5 min e, em seguida, lavadas em água deionizada (DI) por três vezes.

Os brotos foram produzidos, no escuro e no claro, nas diversas concentrações propostas para cada um dos elicitores (AS, AC, sacarose ou solução salina), e água destilada como controle, sem substrato, em caixas plásticas transparentes (11 x 11 x 3 cm), na proporção de 50 brotos por caixa compondo cada repetição, quatro repetições por tratamento, temperatura de 25 °C, com colheita no quinto dia. Foi utilizado germinador tipo Mangelsdorf no tratamento claro, com luz natural e no tratamento escuro o germinador foi revestido com cobertura escura. As sementes foram germinadas apenas em água, e com um dia após a semeadura (DAS), brotos com o mesmo padrão de desenvolvimento foram transferidos para novas caixas plásticas com 12 mL de água ou elicitor, até a colheita. Coletaram-se 15 brotos centrais em cada uma das quatro repetições e mediram-se o comprimento da parte aérea (CPA), raiz (CR) e total (CT) e calculada a relação CR:CPA dividindo-se o comprimento da raiz pelo da parte aérea. Cada parte foi separada e seca em estufa a 65 °C por 24 h, obtendo-se a massa seca de parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST). Foram calculados índices, a saber, Índice de Matéria Seca Total (I MST), dividindo-se a MST de cada tratamento pela MST do respectivo controle e o Índice de Matéria Seca Total pelo comprimento total ($I \text{ MST} \cdot \text{CT}^{-1}$), o qual foi obtido primeiramente pela divisão da MST pelo CT e posteriormente a $\text{MST} \cdot \text{CT}^{-1}$ de cada tratamento pela $\text{MST} \cdot \text{CT}^{-1}$ do respectivo controle.

As dosagens e concentrações utilizadas para os ensaios com AS e AC foram determinadas em função dos resultados obtidos em ensaios anteriores (Duarte *et al.*, 2023).

5.1 Ensaio com Ácido Salicílico

Os tratamentos com ácido salicílico (AS) foram conduzidos nas concentrações de zero, 45, 90, 135, 180 e 225 mg L⁻¹. Foram utilizados 12 mL de água destilada para embebição das sementes, e posteriormente aplicações de 12 mL das soluções de AS até completar o ciclo, conforme o Quadro 1. Os brotos foram mantidos nas caixas plásticas destampadas e em câmara de germinação, com temperatura constante de 25 °C até a colheita. Foi conduzido um experimento com a câmara de germinação no escuro e outro no claro.

5.2 Ensaio com Ácido Ascórbico

Os tratamentos com ácido ascórbico (AC) foram conduzidos nas concentrações de zero; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5 g L⁻¹. Foram utilizados 12 mL de água destilada para embebição das sementes, e posteriormente aplicações de 12 mL das soluções do AC até completar o ciclo, conforme Quadro 1. Os brotos foram mantidos nas caixas plásticas destampadas e em câmara de germinação, com temperatura constante de 25 °C até a colheita. Foi conduzido um experimento com a câmara de germinação no escuro e outro no claro.

5.3 Ensaio com Sacarose

Os tratamentos com sacarose foram conduzidos nas concentrações de zero; 0,25, 0,5 e 1% de solução de sacarose. Foram utilizados 12 mL de água destilada para embebição das sementes, e posteriormente aplicações de 12 mL das soluções de sacarose até completar o ciclo, conforme Quadro 1. Os brotos foram mantidos nas caixas plásticas destampadas e em câmara de germinação com temperatura constante de 25 °C até a colheita. Foi conduzido um experimento com a câmara de germinação no escuro e outro no claro.

5.4 Ensaio com Solução Salina

Os tratamentos com salinidade moderada foram conduzidos nas concentrações de zero; 25, 50 e 75 mM de solução salina. Foram utilizados 12 mL de água destilada para embebição das sementes, e posteriormente aplicações de 12 mL de soluções salinas até completar o ciclo, conforme Tabela 2. Os brotos foram mantidos nas caixas plásticas destampadas e em câmara de germinação com temperatura constante de 25 °C até a colheita. Foi conduzido um experimento com a câmara de germinação no escuro e outro no claro.

Tabela 2 - Tratamento dos brotos com a aplicação exógena de elicitores

	Dias após semeadura				Total aplicado por repetição
	1	2	3	4	
Todos os ensaios	Seleção de brotos	-	-	-	
Ensaio 1	+ 12 mL solução de AS nas diferentes concentrações	+ 12 mL solução de AS nas diferentes concentrações	+ 12 mL solução de AS nas diferentes concentrações	Colheita	36 mL
Ensaio 2	+ 12 mL solução de AC nas diferentes concentrações	+ 12 mL solução de AC nas diferentes concentrações	+ 12 mL solução de AC nas diferentes concentrações	Colheita	36 mL
Ensaio 3	+ 12 mL solução de sacarose nas diferentes concentrações	+ 12 mL solução de sacarose nas diferentes concentrações	+ 12 mL solução de sacarose nas diferentes concentrações	Colheita	36 mL
Ensaio 4	+ 12 mL solução salina nas diferentes concentrações	+ 12 mL solução salina nas diferentes concentrações	+ 12 mL solução salina nas diferentes concentrações	Colheita	36 mL

Fonte: O autor.

Ensaio 1 – Ác. Salicílico; Ensaio 2 – Ác. Ascórbico; Ensaio 3 – Sol. Sacarose e Ensaio 4 – Sol. Salina.

5.5 Bioquímica

Extração enzimática

Quatro sub-amostras de aproximadamente 1 grama de brotos de cada tratamento foram congeladas em nitrogênio líquido e depois moído em almofariz e pilão. À massa desintegrada foi adicionado tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,8) contendo 0,4 g de polivinilpirrolidona, ditioneitol 2 mM, EDTA 0,1 mM e 1,25 mM de PEG 4000 a 4 °C. Os extratos foram centrifugados a 12.000 g por 20 minutos e o sobrenadante foi dividido em quatro alíquotas, uma das quais foi usada para

quantificação de proteínas (B Bradford, 1976). O restante das alíquotas foi imediatamente analisado ou armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e então usado para medir a atividade enzimática.

Superóxido dismutase (SOD, EC.1.15.11).

A atividade da SOD foi medida de acordo com o método descrito em Moriya *et al.* (2015). Uma unidade de SOD (mg proteína^{-1}) foi definida como a enzima atividade capaz de inibir a fotorredução de nitro blue tetrazólio (NBT) para formazan azul em 50%. Foram adicionados cinquenta microlitros do extrato enzimático a 2950 μL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,8) adicionado de 1,3 μM de riboflavina, 13 mM de metionina e 63 μM de NBT. Os tubos foram incubados a 25°C por 15 minutos sob luz fluorescente, após o que a absorbância foi medida a 560 nm. Tubos contendo a mesma mistura e 50 μL do tampão de extração e sem extratos foram usados como controle. Os dados de atividade de SOD foram normalizados pelo conteúdo de proteína de acordo com o método Bradford (1976) e expresso em unidades de SOD por miligrama de proteína (Lei; Song; Fu, 2005).

Peroxidase (PRX, EC. 1.11.1.7)

Quatro subamostras de 300 mg de brotos foram congelados em nitrogênio líquido, triturados em almofariz com pilão, homogeneizado em 3 mL de tampão fosfato sódio 0,01 mol L^{-1} (pH 6,0) e centrifugado a 12.000rpm por 25 minutos a 4°C . A atividade PRX foi medida pela adição de um micrograma de proteína ajustado, em função da quantificação de proteína do extrato, para 100 μL do sobrenadante em 2,9 mL de tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 6,0) (Araújo *et al.*, 2005) adicionado de 13 mM de guaiacol e 5 mM de H_2O_2 (Moriya *et al.*, 2015). A mistura foi incubada por 20 minutos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, após o que sua absorbância foi medida em espectrofotômetro a 470 nm. A atividade enzimática foi expressa $\text{nmol of H}_2\text{O}_2 (\text{mg protein})^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Extração e determinação de fenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante

Os brotos frescos de cinco dias (incluindo cotilédones e raízes), obtidos dos experimentos já descritos, foram lavados com água destilada e batidos em liquidificador por cinco minutos, misturados com etanol 70% (70:30, etanol:água, v/v) a uma proporção 1:3 (massa/volume). O extrato foi conservado sobre gelo por outros cinco minutos, filtrado à vácuo, distribuído em placas de Petri com um mL de acetona, mantidos em capela de exaustão por uma hora e então secos em estufa a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ até

alcançar o ponto de graxa. Os materiais foram recolhidos em tudos plásticos com tampa e armazenados no escuro. Com o extrato graxo foram determinados o conteúdo de fenóis totais, flavonoides totais e a atividade antioxidante. Para tanto 10 mg de extrato graxo foram solubilizados em 10 mL de etanol 70% para produção das amostras de trabalho.

Fenóis totais

O conteúdo de fenóis totais nos brotos foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu (Jayaprakasha *et al.*, 2001) com modificações usando ácido gálico para construir a curva padrão. O procedimento foi realizado em tubos de ensaio com capacidade de 3,0 mL. Um volume de 100 μL das amostras de trabalho foi misturado a 500 μL do reagente Folin-Ciocalteu 10% que foram homogeneizados, permanecendo em descanso por 5 min. A seguir foram adicionados 400 μL de solução de carbonato de sódio 25% (m/v). Os tubos de ensaio foram agitados e mantidos no escuro à temperatura ambiente por 30 min. Decorrido o tempo, a absorbância foi determinada a 765 nm, utilizando espectrofotômetro com cubetas de quartzo. Para a elaboração da curva analítica padrão, foi utilizado o ácido gálico nas concentrações de 5 a 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluído em álcool etílico absoluto. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por 100 g de extrato graxo.

Flavonoides totais

A quantificação de flavonoides totais foi realizada de acordo com Yao *et al.* (2013). Foi adicionada em tubo de ensaio uma alíquota de 500 μL da amostra de trabalho junto com 300 μL de acetato de potássio 0,1 M e 200 μL de solução cloreto de alumínio (AlCl_3) 0,1 M. Após 20 minutos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 410 nm e o branco utilizado foi a mistura de todos os reagentes exceto a amostra. Para a elaboração da curva analítica padrão, foi utilizada rutina diluída em álcool etílico absoluto nas concentrações de 2,5 a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos em mg equivalente de rutina por 100 g de extrato graxo.

Atividade antioxidante

Para a avaliação da capacidade antioxidante no sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidraliza (DPPH) foi utilizada a metodologia descrita por Blois (1958) com algumas modificações. Uma mistura reacional contendo 1 mL de tampão acetato

(100 mmol L⁻¹ / pH 5,5), 1,25 mL de etanol absoluto, 250 µL de solução metanólica de DPPH (50 µM) e amostras de trabalho de 125, 250, 500 e 1000 µL que foram agitadas em vórtex e permaneceram em repouso por um período de 30 minutos em ambiente escuro. O DPPH apresenta máxima absorvância a 517 nm, que decresce na presença de moléculas doadoras de H⁺, indicado pela mudança da coloração roxa para amarelo. A atividade sequestradora do radical DPPH• foi expressa em porcentagem, sendo calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\%AA = \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100$$

Onde, $A_{controle}$ é a absorvância do DPPH e $A_{amostra}$ é a absorvância da amostra após 30 minutos. Da porcentagem de inibição de DPPH, por regressão linear, foi calculada a concentração inibitória (IC 50), que é, a concentração do extrato, em mg de extrato graxo, capaz de reduzir 50% da concentração inicial de DPPH.

5.6 Análise Estatística

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial dos tratamentos (doses dos elicitores x condição de luminosidade (claro/escuro) com quatro repetições por tratamento. Os resultados de comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), comprimento total (CT), relação raiz parte aérea (R R/PA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST) foram submetidos a análise de variância e quando significativa as doses foram analisadas por regressão polinomial testando-se ajuste linear ou quadrático. Quando houve significância do fator condição de luminosidade o teste F foi considerado definitivo.

As análises bioquímicas (proteína solúvel, atividade de superóxido dismutase – SOD, atividade de peroxidase - PRX, fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante) foram realizadas a partir de material vegetal obtido em ensaios inteiramente casualizados com arranjo fatorial dos tratamentos (doses dos elicitores x condição de luminosidade) com três repetições biológicas e três repetições técnicas compondo nove leituras por tratamento. Os resultados foram submetidos a análise de variância e quando significativa as doses foram analisadas por regressão polinomial testando-se ajuste linear ou quadrático. Quando houve significância do fator condição

de luminosidade o teste F foi considerado definitivo. Todas as análises utilizaram o software Sisvar (Ferreira, 2011).

Em complemento às análises, foram calculados índices de modo a poder analisar todos os elicitores juntos, dividindo o valor obtido em um determinado tratamento pelo valor obtido no controle (0 escuro).

- I MST - calculado dividindo-se o valor de matéria seca total de cada tratamento pelo valor obtido no respectivo controle sem elicitor crescido no escuro.
- I MST.CT⁻¹ - calculado dividindo-se a matéria seca total pelo comprimento total de cada repetição e depois dividindo-se o valor obtido por cada tratamento pelo respectivo controle sem elicitor crescido no escuro.
- I IC 50 - calculado dividindo-se o valor de concentração inibitória (IC 50) de cada tratamento pelo valor obtido no respectivo controle sem elicitor crescido no escuro.
- I AA - calculado dividindo-se o valor de atividade antioxidante (AA) de cada tratamento pelo valor obtido no respectivo controle sem elicitor crescido no escuro.

Para análise estatística foram considerados 38 tratamentos (todos os elicitores e concentrações), em delineamento inteiramente casualizado e teste F. Quando significativo as médias foram agrupadas por Scott-Knott com 5% de significância.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Ácido Salicílico

A aplicação das doses de AS especificadas (Tabela 3), demonstram que houve diferenciação estatística da condição (A) para os parâmetros CPA, CR, CT e MSR, quando os brotos foram produzidos no escuro, em função do estiolamento que ocorre nessa condição. Verifica-se que para esta condição, houve um ajuste linear decrescente quando analisamos os parâmetros acima citados. Ao verificamos R R/PA, percebemos diferenciação estatística para os brotos produzidos no claro, também com ajuste linear decrescente em função das doses.

Tabela 3 - Comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), comprimento total (CT, cm), relação raiz/parte aérea em comprimento (R R/PA), massa seca de parte aérea (MSPA, g), massa seca de raiz (MSR, g) e massa seca total (MST, g) de brotos de feijão tratados com solução de ácido salicílico.

Tratamentos	CPA	CR	CT	R R/PA	MSPA	MSR	MST
Condição (A)							
Escuro	10,1200	4,0400	14,1600	0,3900	0,5479	0,0385	0,5863
Claro	4,8700	3,0100	7,8800	0,6200	0,6505	0,0317	0,6822
Dose mg L ⁻¹ (B)							
0	8,3250	5,0300	13,3600	0,6800	0,5813	0,0450	0,6263
45	7,8300	3,9400	11,7700	0,5500	0,5970	0,0375	0,6345
90	7,7500	3,8300	11,5800	0,5400	0,5991	0,0360	0,6351
135	7,2200	3,1900	10,4200	0,4800	0,5995	0,0326	0,6321
180	7,1300	2,8800	10,0200	0,4300	0,6018	0,0306	0,6324
225	6,7000	2,3000	9,0000	0,3600	0,6165	0,0286	0,6451
	L ¹	L ²	L ³	L ⁴	ns	L ⁵	ns
Valores de F							
A	1003,0210 **	88,3740 **	695,4190 **	251,3670 **	146,0310 **	33,0600 **	117,9500 **
B	8,2690 **	50,9270 **	27,7490 **	39,7620 **	1,1700 ns	16,4990 **	0,3270 ns
A*B	7,8950 **	2,4180 ns	6,8130 **	7,0450 **	2,2780 ns	0,8050 ns	2,4420 ns

Fonte: O autor.

¹L CPA = 8,2611 - 0,0068 x R² = 0,9686 **

²L CR = 4,775 - 0,01109 x R² = 0,9562 **

³L CT = 13,038 - 0,0179 x R² = 0,9643 **

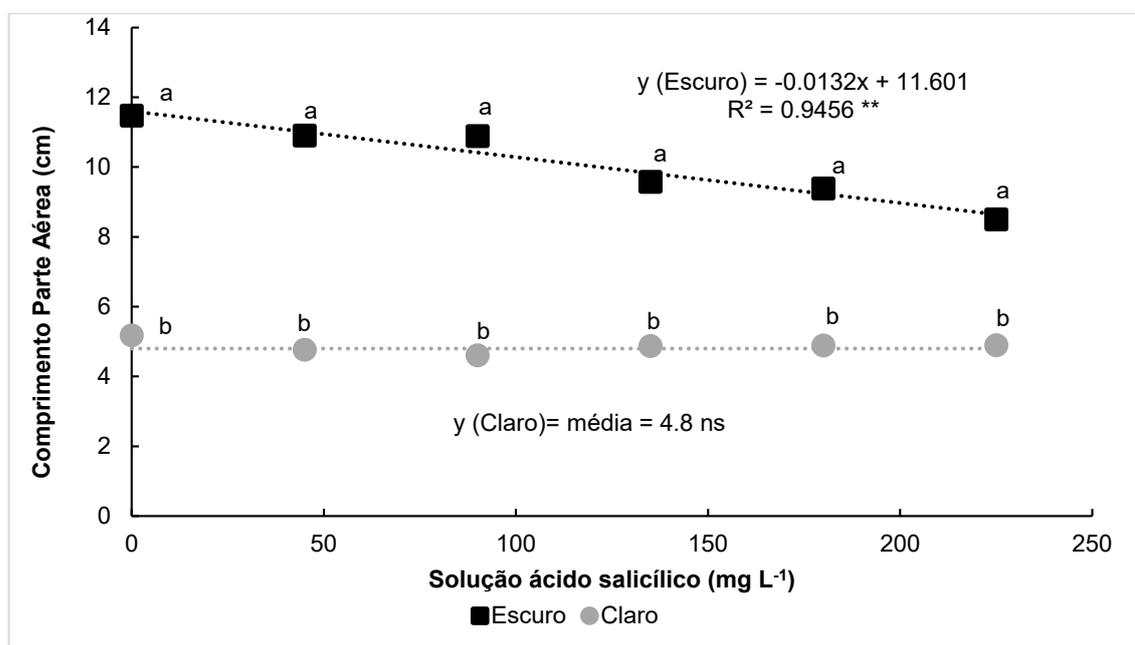
⁴L R R/PA = 0,6504 - 0,001278 x R² = 0,9563**

⁵L MSR = 0,0426 - 0,000067 x R² = 0,9275 **

Sadeghipour e Monem (2021), verificaram que a toxicidade do AS reduziu acentuadamente o valor da clorofila, o conteúdo relativo de água, o comprimento da parte aérea, a biomassa da parte aérea e da raiz, a área foliar e o rendimento de sementes, divergindo parcialmente dos resultados aferidos neste trabalho com crescimento de brotos.

A estatística demonstra que houve interação entre os fatores estudados (A) e (B), quanto ao CPA, CT e R R/PA. Para CPA observa-se que os comprimentos da parte aérea foram superiores para brotos produzidos no escuro, com um decréscimo linear em função do aumento das dosagens. Para a brotos produzidos no claro não houve significância, o CPA permaneceu constante em 4,8 cm (Figura 6).

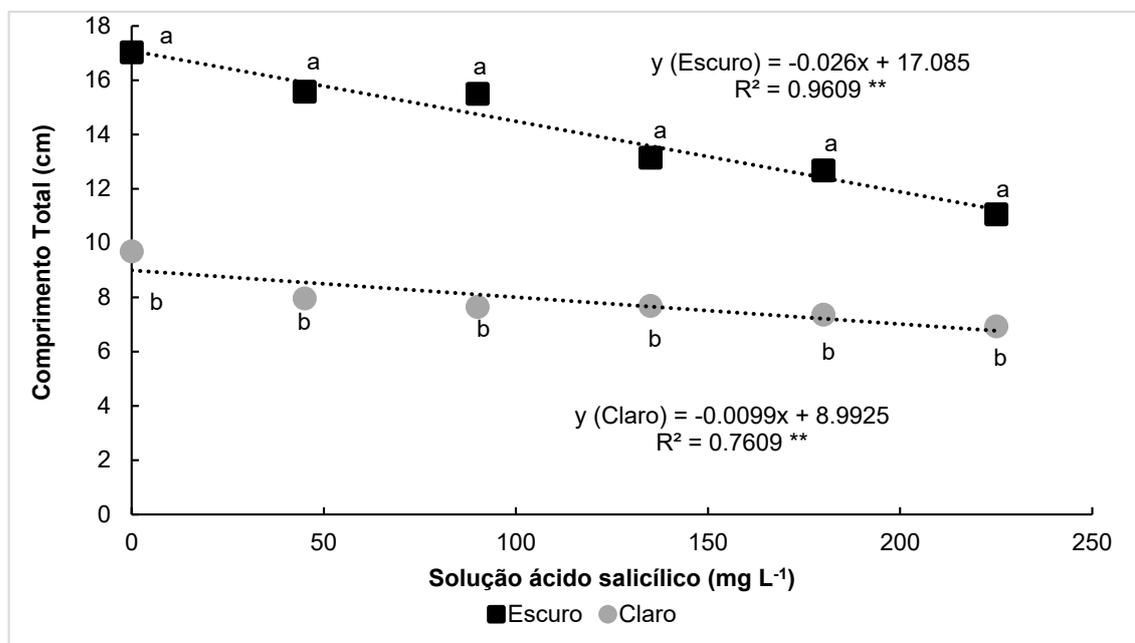
Figura 6 – Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido salicílico para Comprimento da Parte Aérea (cm). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

O Comprimento total (CT), foi maior quando cultivado no escuro, com ajuste linear decrescente em função do aumento das dosagens. Quando cultivado no claro, os brotos tiveram um crescimento menor, diminuindo em 0,0099 cm a cada aumento de dosagem (Figura 7).

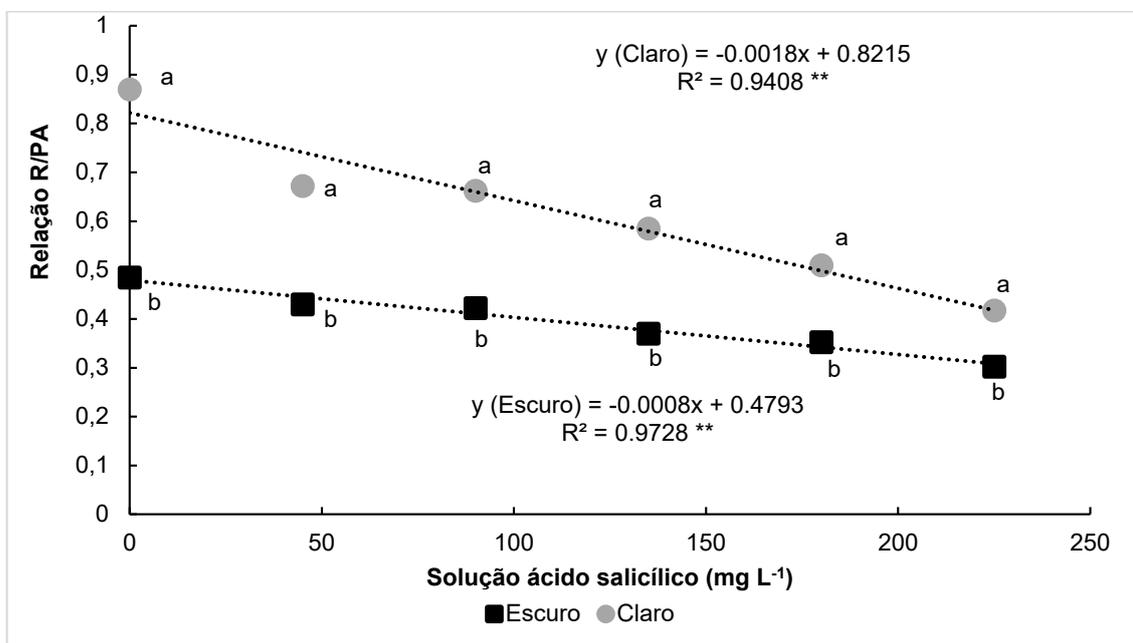
Figura 7 - Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido salicílico para Comprimento Total (cm). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

A relação raiz parte aérea (R R/PA) foi maior quando os brotos foram cultivados no claro, demonstrando que as raízes, embora tenham tido também um ajuste linear decrescente, possivelmente reduziram-se mais no claro (Figura 8).

Figura 8 - Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido salicílico para Relação R R/PA. (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

Neste estudo, as concentrações de AS variaram de 45 a 225 mg L⁻¹, que equivale a 0,326 a 1,629 mmol L⁻¹.

Jing, Yongqi e Jun (2022), verificaram que o tratamento com AS (aplicação exógena de 1 mmol L⁻¹ por dia), inibiu o crescimento de brotos, resultou em diminuição significativa na biomassa e aumento significativo na permeabilidade eletrolítica, teor de proteína livre, capacidade antioxidante total, atividade da glutatona peroxidase e teor de melatonina (P<0,05).

De acordo com Azmat *et al.* (2020), a partir dos resultados obtidos em seu trabalho, o AS teve um efeito estimulador no crescimento do trigo em termos de comprimento da planta, peso fresco e seco, bem como área foliar.

A Tabela 4 identificou uma maior quantidade de Proteínas Solúveis (PROT), quando os brotos foram produzidos no claro e uma maior quantidade de Fenóis (FE) quando conduzidos no escuro.

Tabela 4 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (PRX), proteína solúvel (PROT), atividade antioxidante (AA), concentração inibitória (IC50) e conteúdo total de fenóis (FE) e flavonoides (FLA) em brotos de feijão mungo-verde tratados com solução de ácido salicílico.

Tratamentos	SOD	PRX	PROT	AA	IC50	FE	FLA
Condição (A)							
Escuro	0,00617	2,2000	7,1000	61,6000	0,6970	3517	1550
Claro	0,00517	2,3000	9,1000	71,6000	0,6260	2279	1838
Dose mg L⁻¹ (B)							
0	0,00549	1,3000	8,3000	60,7000	0,6020	2883	1278
45	0,00727	2,5000	6,0000	68,6000	0,6510	2812	1744
90	0,00611	2,4000	7,3000	67,7000	0,6830	2954	1724
135	0,00480	2,3000	9,1000	70,9000	0,6800	2458	1844
180	0,00465	2,2000	9,7000	66,7000	0,6680	3194	1702
225	0,00570	2,7000	8,3000	65,1000	0,6860	3086	1872
	ns	ns	ns	Q ¹	ns	ns	ns
Valores de F							
A	2,3480 ns	0,1550 ns	4,2640 *	19,6550 **	1,9990 ns	16,7740 **	2,0610 ns
B	1,4410 ns	2,0070 ns	1,3250 ns	1,5710 ns	0,2720 ns	0,4770 ns	0,7680 ns
A*B	0,1560 ns	0,6570 ns	0,5730 ns	3,2980 *	0,2980 ns	1,5680 ns	1,3870 ns

Fonte: O autor.

Unidades: SOD uni (mg proteína⁻¹); PRX nmol of H₂O₂ (mg protein)⁻¹ min⁻¹; PROT mg gMS⁻¹; AA %; IC50 mg extrato graxo mL⁻¹;

Fenóis Totais e Flavonoides Totais mg (100 g extrato graxo)⁻¹,

¹Q AA = 61,593 + 0,1323 x - 0,000533 x² R² = 0,8103 P<0,026

A aplicação de baixas concentrações de AS alivia a sensibilidade ao estresse abiótico nas plantas corroborando os dados exibidos por Nawaz *et al.* (2021) e Duarte *et al.* (2023), enquanto altas concentrações (geralmente mais de 1 mM) induziram altos níveis de estresse oxidativo, levando à diminuição da tolerância ao estresse abiótico e redução do crescimento (Chandra *et al.*, 2007; Machado Neto; Durães, 2006; Miura; Tada, 2014).

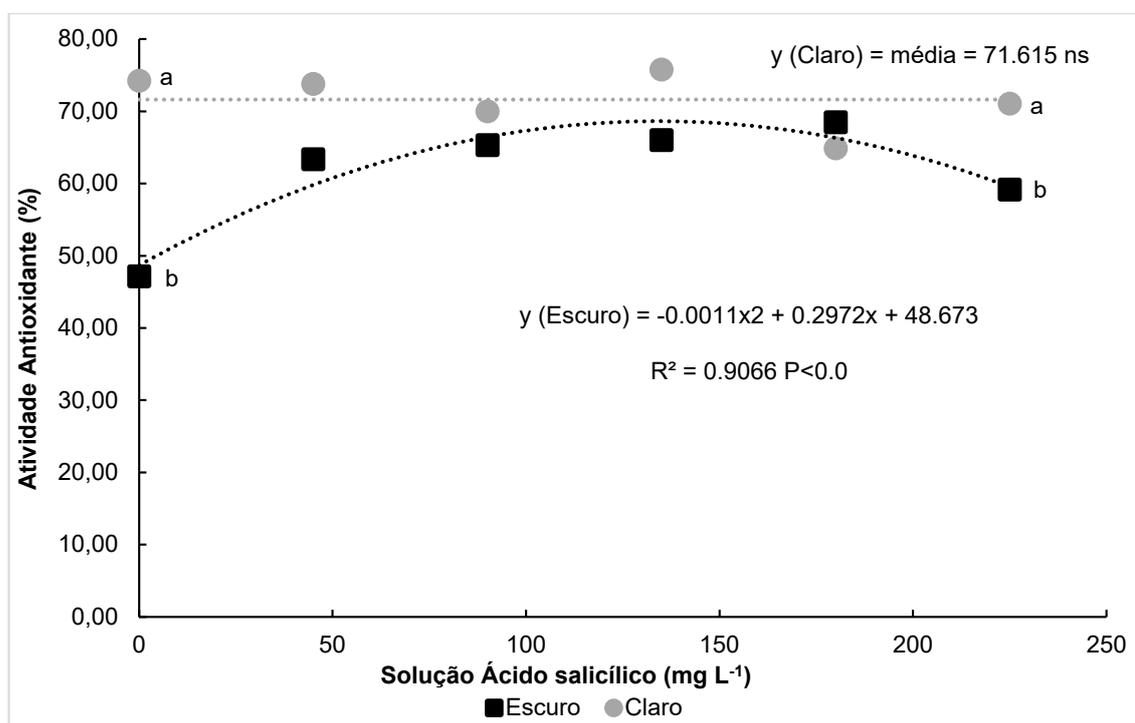
Sadeghipour e Monem (2021), verificaram que o AS aumentou o acúmulo de AS nas raízes, parte aérea e sementes, malondialdeído (MDA), conteúdo de prolina e também atividades de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR), diferindo dos resultados ora analisados.

Gómez-Velázquez, Aparicio-Fernández e Reynoso-Camacho (2021), avaliaram os efeitos da elicitación química utilizando ácido salicílico (AS) e peróxido

de hidrogênio (H_2O_2) em condições de germinação otimizada sobre o vigor dos brotos de chia, assim como o conteúdo fenólico e suas capacidades antioxidantes in vitro, dentre outros estudos. Os resultados demonstraram que os brotos de chia induzidos com 1 mM de AS são uma fonte de compostos antioxidantes que podem ser usados para diminuir o estresse oxidativo.

Houve o desdobramento da interação entre condição de luminosidade e doses de AS, para a Atividade Antioxidante (AA), sendo que apresentaram resultados mais elevados os brotos produzidos no claro, independentemente das dosagens. Com relação à AA dos brotos produzidos no escuro, o ponto de máxima AA ocorreu com a dosagem de $135,09 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 9).

Figura 9 - Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido salicílico para Atividade Antioxidante (%). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

6.2 Ácido Ascórbico

Aplicação de ácido ascórbico (AC), apresentada na Tabela 5, demonstra que houve significância no fator luminosidade, para os parâmetros CPA e CT quando

cultivados no escuro, assim como para R R/PA, MSPA e MST quando cultivados no claro, Para CPA, CT, R R/PA, MSPA e MST, os resultados decresceram linearmente a partir do controle.

Tabela 5 - Comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), comprimento total (CT, cm), relação raiz/parte aérea em comprimento (R R/PA), massa seca de parte aérea (MSPA, g), massa seca de raiz (MSR, g) e massa seca total (MST, g) de brotos de feijão mungo-verde tratados com solução de ácido ascórbico.

Tratamentos	CPA	CR	CT	R R/PA	MSPA	MSR	MST
Condição (A)							
Escuro	8,9700	6,2500	15,2200	0,6900	0,5273	0,0549	0,5822
Claro	5,7900	5,7800	11,5700	1,0000	0,5643	0,0576	0,6219
Dose g L ⁻¹ (B)							
0	8,8100	7,0700	15,9000	0,8300	0,5574	0,0588	0,6161
0,3125	7,5000	6,4000	13,9000	0,8800	0,5561	0,0581	0,6143
0,625	7,9200	6,9300	14,8000	0,9000	0,5428	0,0556	0,5984
1,25	6,7500	5,5500	12,3000	0,8800	0,5519	0,0558	0,6076
2,5	5,9400	4,1200	10,1000	0,7100	0,5206	0,0530	0,5736
	L ¹	L ²	L ³	Q ⁴	ns	ns	L ⁵
Valores de F							
A	549,8750 **	3,4070 ns	104,4390 **	103,1980 **	17,7740 **	4,0610 ns	18,1470 **
B	52,4370 **	18,0380 **	32,7330 **	4,9440 **	2,3900 ns	2,3360 ns	2,7620 *
A*B	14,3390 **	3,2190 ns	7,1400 **	0,1470 ns	2,7270 ns	5,4090 ns	3,0050 *

Fonte: O autor.

¹L CPA = 8,3495 - 1,0314 x R² = 0,8634 **

²L CR = 7,1212 - 1,1=820 x R² = 0,9254 **

³L CT = 15,4714 - 2,2135 x R² = 0,9182 **

⁴Q R R/PA = 0,8433 + 0,124 x - 0,0706 x² R² = 0,9821**

⁵L MST = 0,6169 - 0,01596 x R² = 0,8295 **

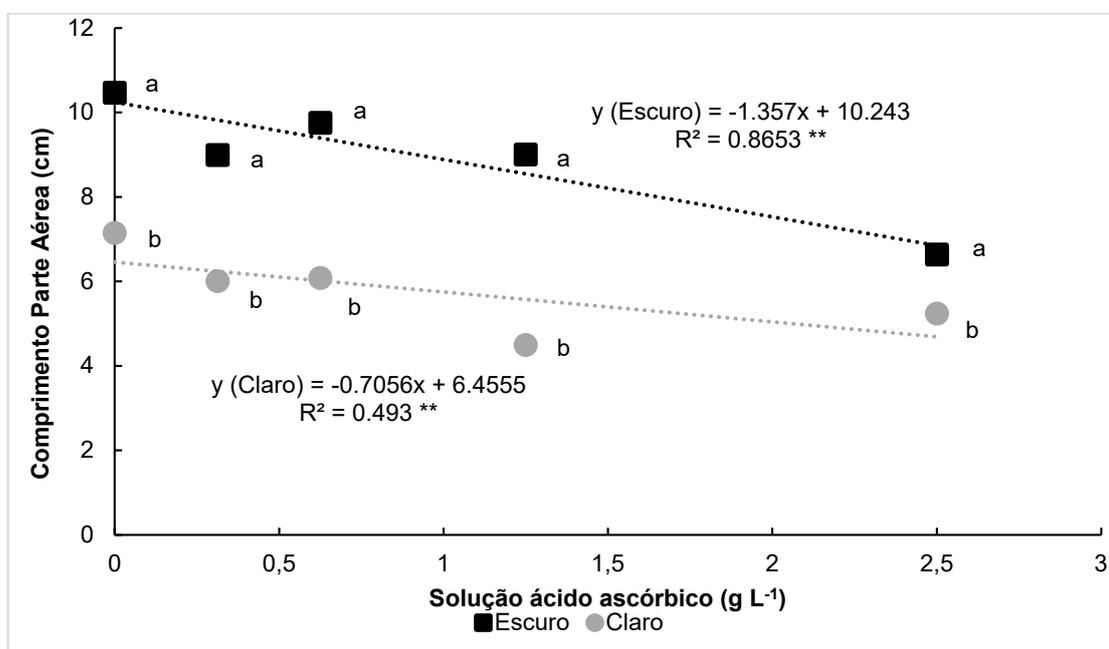
O feijão mungo germinado serve como uma fonte barata de proteína e ácido ascórbico, que são dependentes do processo de brotação, daí a importância de seguir o processo biológico (Tjandra Nugraha *et al.*, 2021). Pesquisadores relataram valores diferentes para o ácido ascórbico no feijão mungo germinado, mas é considerado um dos componentes mais relevantes do processo de germinação (Tang *et al.*, 2014; Thippeswamy *et al.*, 2015).

Percebeu-se que o tratamento em plantas de grão de bico, com ácido ascórbico, glutatona, prolina e combinação causou aumento significativo em todas as características de crescimento em plantas não estressadas e estressadas em comparação com plantas não estressadas (El-Beltagi; Mohamed; Sofy, 2020).

Wojdyło *et al.* (2020), afirmam que os resultados obtidos em seu trabalho mostram que os brotos selecionados (rabanete, lentilha, erva-preta, brócolis, girassol, alho-poró, beterraba, feijão mungo) possuem forte capacidade antioxidante devido ao alto teor de polifenóis e ácido L-ascórbico.

A Figura 10, para o desdobramento da interação entre luminosidade e doses de ácido ascórbico, referente a Comprimento da Parte Aérea (cm), demonstra que houve um ajuste linear decrescente para ambas as condições, onde os brotos produzidos no escuro apresentaram maior comprimento da parte aérea.

Figura 10 - Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido ascórbico para Comprimento da Parte Aérea (cm). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)

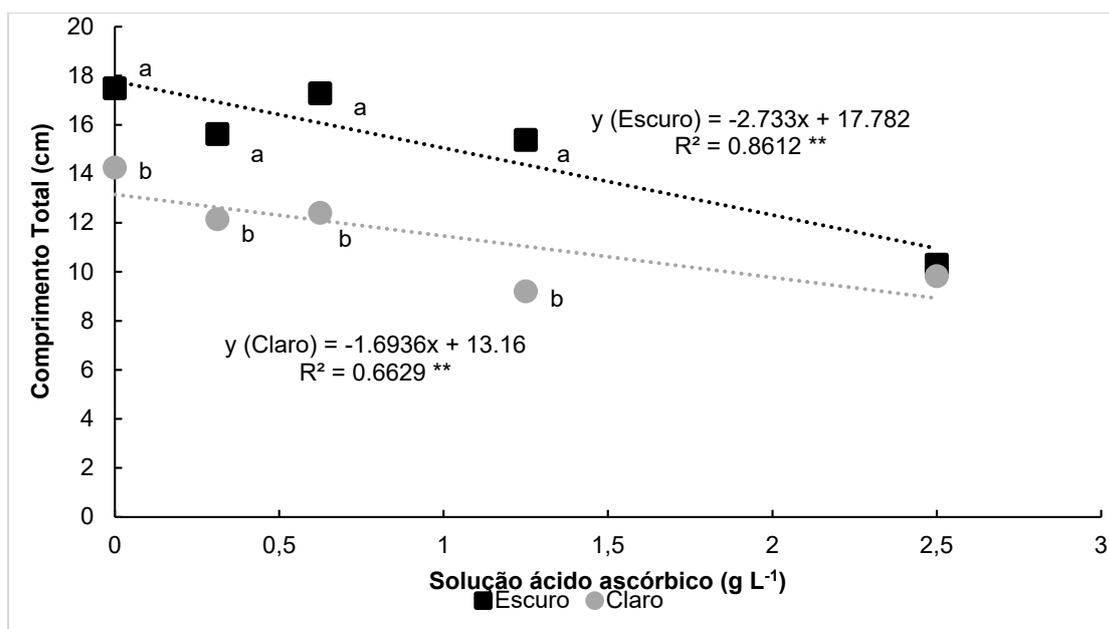


Fonte: O autor.

De conformidade com a Figura 11, para o desdobramento da interação entre luminosidade e doses de ácido ascórbico, para Comprimento Total (cm), nos mostra que para ambas as condições de luminosidade, houve um ajuste linear

decrecente com o aumento da dose de ácido ascórbico, onde os brotos produzidos no escuro apresentaram maior comprimento total.

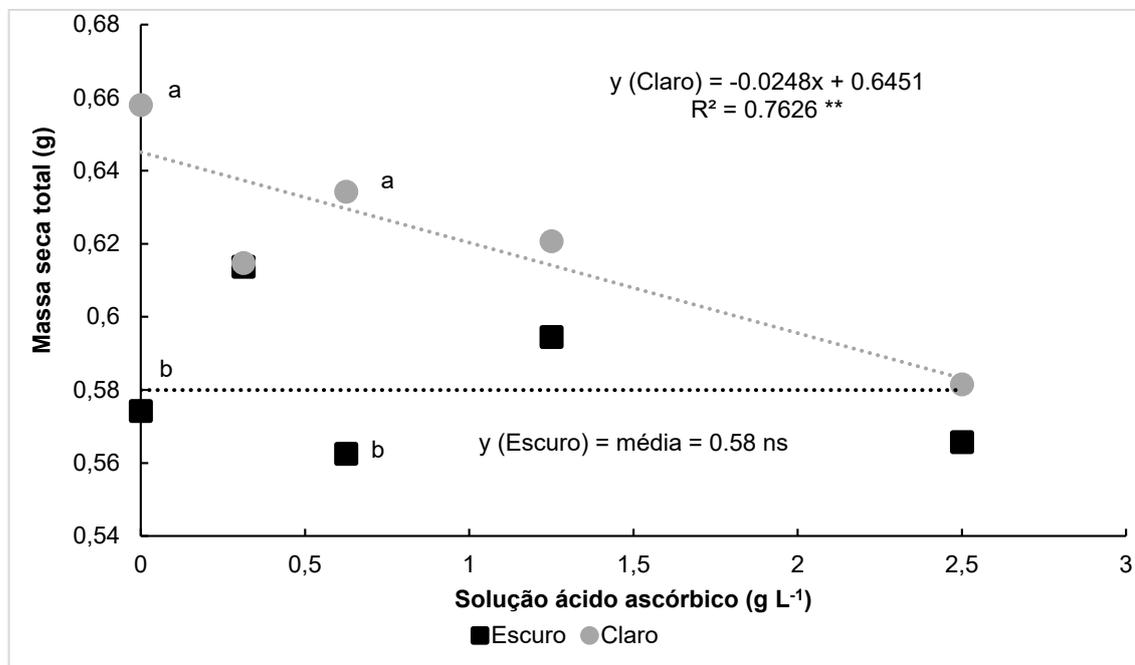
Figura 11 - Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido ascórbico para Comprimento Total (cm). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

A Figura 12, para o desdobramento da interação entre luminosidade e doses de ácido ascórbico, para Massa seca total (g), nos mostra que os brotos produzidos no escuro, independentemente das doses, obtiveram uma mesma média de peso (g), e para os brotos produzidos no claro, houve um ajuste linear decrescente em função do aumento das doses de ácido ascórbico. Brotos produzidos no claro apresentaram maior massa seca (g) para as menores dosagens

Figura 12 - Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido ascórbico para Massa Seca Total (g). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

A Tabela 6 mostra que houve o desdobramento da interação entre luminosidade de doses de ácido ascórbico, para a atividade da enzima guaiacol peroxidase (PRX) e proteína solúvel (PROT).

Tabela 6 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (PRX), proteína solúvel (PROT), atividade antioxidante (AA), concentração inibitória (IC50) e conteúdo total de fenóis (FE) e flavonoides (FLA) em brotos de feijão mungo-verde tratados com solução de ácido ascórbico.

Tratamentos	SOD	PRX	PROT	AA	IC50	FE	FLA
Condição (A)							
Escuro	0,0090	1,7500	5,3000	58,6000	0,8460	3351	1134
Claro	0,0054	1,3600	8,2000	62,3000	0,8030	2417	1512
Dose g L ⁻¹ (B)							
0,000	0,0106	1,7400	4,4000	45,7000	1,1500	2953	1719
0,313	0,0080	1,2000	5,5000	59,0000	0,8020	2268	958
0,625	0,0070	1,3000	6,7000	59,7000	0,8840	2886	1399
1,250	0,0067	1,7800	7,3000	61,0000	0,7880	2879	1357
2,500	0,0038	1,6900	9,8000	77,5000	0,4930	3277	1245
	L ¹	ns	L ²	L ³	L ⁴	ns	ns
Valores de F							
A	28,9610**	3,3440 ns	46,9400 **	1,8770 ns	0,2010 ns	9,9580 **	10,6570 **
B	11,0940**	1,4510 ns	17,8000**	14,5860 **	4,8440 **	1,2260 ns	4,5380 ns
A*B	1,8410 ns	3,7860 *	4,2800 *	1,9190 ns	0,6670 ns	1,5760 ns	0,8500 ns

Fonte: O autor.

Unidades: SOD uni (mg proteína⁻¹); PRX nmol of H₂O₂ (mg protein)⁻¹ min⁻¹; PROT mg gMS⁻¹; AA %; IC50 mg extrato graxo mL⁻¹;

Fenóis Totais e Flavonoides Totais mg (100 g extrato graxo)⁻¹,

¹L SOD = 0,009402 - 0,00233x R² = 0,8781 P<0,01

²L PROT = 4,834 + 2,03624x R² = 0,9715 P<0,01

³L AA = 50,526 + 10,711x R² = 0,8745 P<0,01

⁴L IC50 = 1,025 - 0,2145x R² = 0,8138 P<0,01

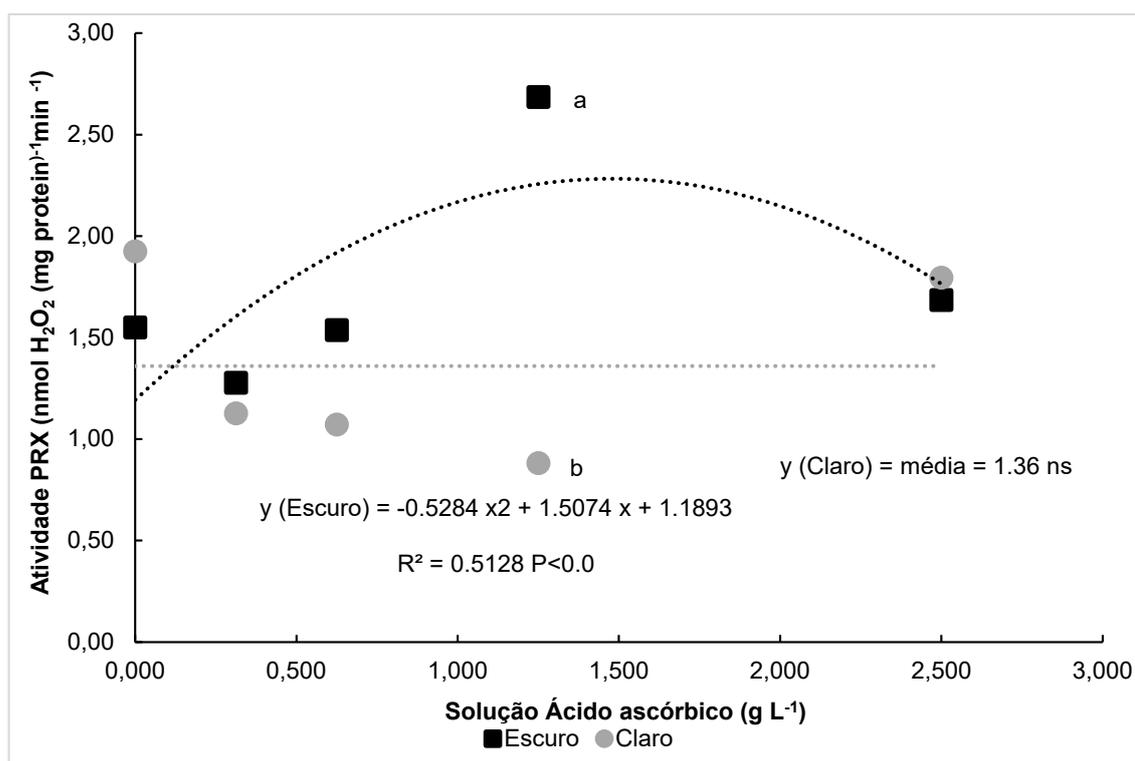
Hu *et al.* (2023), verificaram que a elicitación com ultrassom (US) e AC aumentaram acentuadamente o conteúdo de prolina e fenólicos totais, resultando ainda na capacidade antioxidante elevada em brotos, como evidenciado pelos valores de observação mais altos de atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e PAL) e capacidades de eliminação de radicais em brotos de soja.

Os brotos de feijão mungo-verde tratados com ácido ascórbico 20 mM apresentaram teor fenólico 22% e 23% maior após 3 e 7 dias de armazenamento, respectivamente. Verificaram ainda que os tratamentos com ácido ascórbico podem

melhorar a qualidade dos brotos armazenados para o consumidor (Sikora; Swieca, 2018).

A Figura 13 apresenta a atividade da enzima peroxidase PRX ($\text{nmol of H}_2\text{O}_2 \text{ (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$), onde verifica-se que os brotos produzidos no claro apresentaram uma média de $1,36 \text{ (nmol of H}_2\text{O}_2 \text{ (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1})$. Os brotos produzidos no escuro apresentaram inicialmente uma atividade PRX inferior à dos brotos produzidos no claro, porém, com o aumento da dosagem, houve aumento da PRX, sendo que a dosagem que gerou maior atividade da PRX, de acordo com a equação do gráfico, foi a de $1,4264 \text{ g L}^{-1}$.

Figura 13 - Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido ascórbico para Atividade PRX ($\text{nmol of H}_2\text{O}_2 \text{ (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)

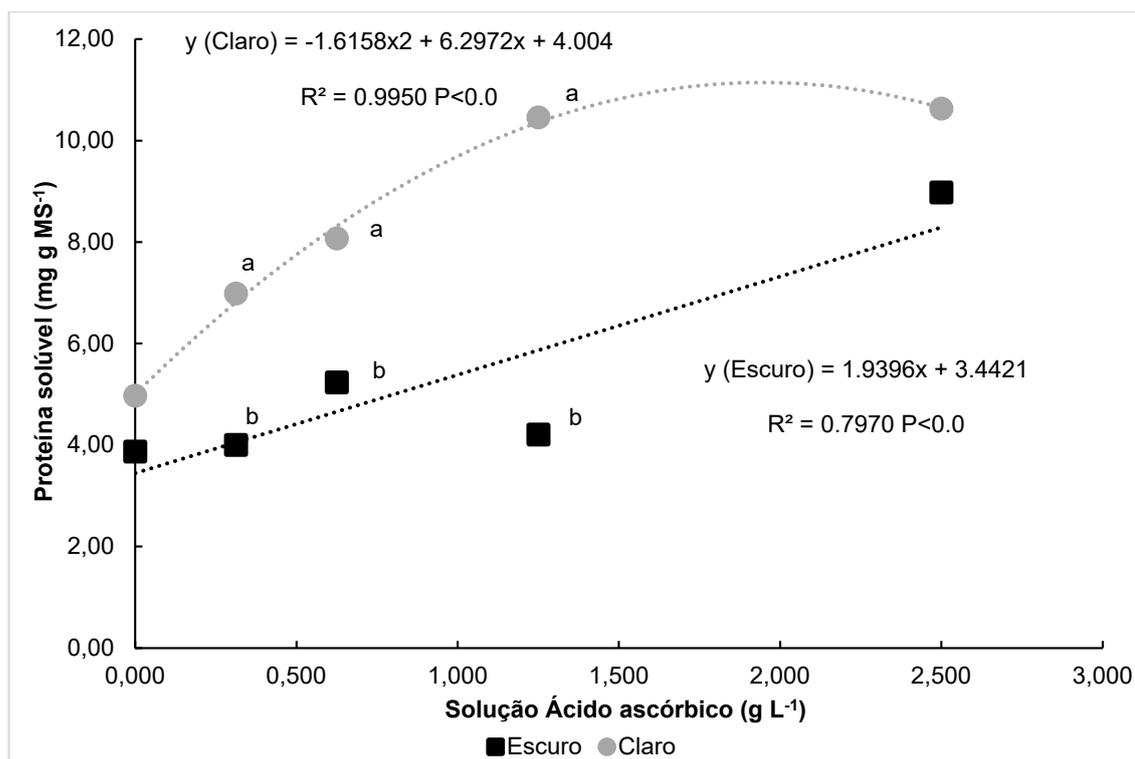


Fonte: O autor.

A Figura 14 apresenta o conteúdo de proteína solúvel (mg gMS^{-1}), onde verifica-se que os brotos produzidos no escuro tiveram aumento da proteína solúvel com ajuste linear crescente em função das doses de ácido ascórbico, embora menores dos que os dados apresentados por brotos produzidos no claro, para todas

as dosagens. Os brotos produzidos no claro apresentariam maior nível de proteínas solúveis para a dosagem de $1,9308 \text{ g L}^{-1}$, de conformidade com a equação da curva.

Figura 14 - Desdobramento da interação entre condição de crescimento dos brotos e doses de ácido ascórbico para Proteína Solúvel (mg gMS^{-1}). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

6.3 Sacarose

Quando aplicamos a solução de sacarose, a Tabela 7 apresenta diferenciação estatística para os brotos produzidos no escuro, quanto ao parâmetro CPA, assim como apresentou diferença estatística para R R/PA e MSR, nos brotos produzidos no claro. Em ambos os casos, o ajuste foi linear decrescente, em função das doses aplicadas.

Tabela 7 - Comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), comprimento total (CT, cm), relação raiz/parte aérea em comprimento (R R/PA), massa seca de parte aérea (MSPA, g), massa seca de raiz (MSR, g) e massa seca total (MST, g) de brotos de feijão mungo-verde tratados com solução de sacarose.

Tratamentos	CPA	CR	CT	R R/PA	MSPA	MSR	MST
Condição (A)							
Escuro	8,0300	5,3500	13,4000	0,6600	0,5643	0,0513	0,6156
Claro	7,1500	5,9800	13,1000	0,8300	0,5534	0,0591	0,6125
Dose % (B)							
0,00	8,7500	6,7800	15,5000	0,8000	0,5255	0,0574	0,5829
0,25	8,0600	6,7300	14,8000	0,8000	0,5763	0,0611	0,6374
0,50	7,3500	5,0000	12,3000	0,7000	0,5555	0,0515	0,6070
1,00	6,2000	4,1700	10,4000	0,7000	0,5781	0,0509	0,6290
	L ¹	L ²	L ³	L ⁴	ns	L ⁵	ns
Valores de F							
A	30,3500 **	3,6650 ns	0,2620 ns	28,2110 **	1,4420 ns	13,0460 **	0,092 ns
B	47,4380 **	15,3510 **	26,1160 **	6,0530 **	7,2250 ns	5,1460 **	5,601 ns
A*B	4,9030 **	2,8440 ns	3,5360 *	2,0580 ns	1,8810 ns	0,7760 ns	1,116 ns

Fonte: O autor.

¹L CPA = 8,7037 - 2,5471x R² = 0,9969 **

²L CR = 6,92 - 2,87x R² = 0,8912 **

³L CT = 15,6267 - 5,4182 x R² = 0,9618 **

⁴L R R/PA = 0,8032 - 0,1388 x R² = 0,5839 **

⁵L MSR = 0,059 - 0,0086 x R² = 0,5656 **

Estudo realizado por Koodkaew (2019), utilizando broto de feijão mungo para avaliar o efeito de soluções de glicose (5, 10, 50, 100, 200 mM), no crescimento do mesmo, verificou que embora o peso fresco do broto tenha diminuído significativamente com o tratamento 150 mM de glicose, o resultado sugere que concentrações de glicose inferiores 150 mM, foram apropriados para melhorar a maioria das propriedades promotoras da saúde, corroborando com os resultados verificados neste trabalho, pois com o aumento da concentração aplicada, verificou-se que o crescimento dos brotos seguiu uma equação linear decrescente.

Yu *et al.* (2023), analisaram sementes de feijão mungo, que foram germinadas com soluções contendo diferentes concentrações de sacarose (10, 20 e 30 g/L). A aplicação de sacarose exógena diminuiu significativamente a altura e a massa fresca

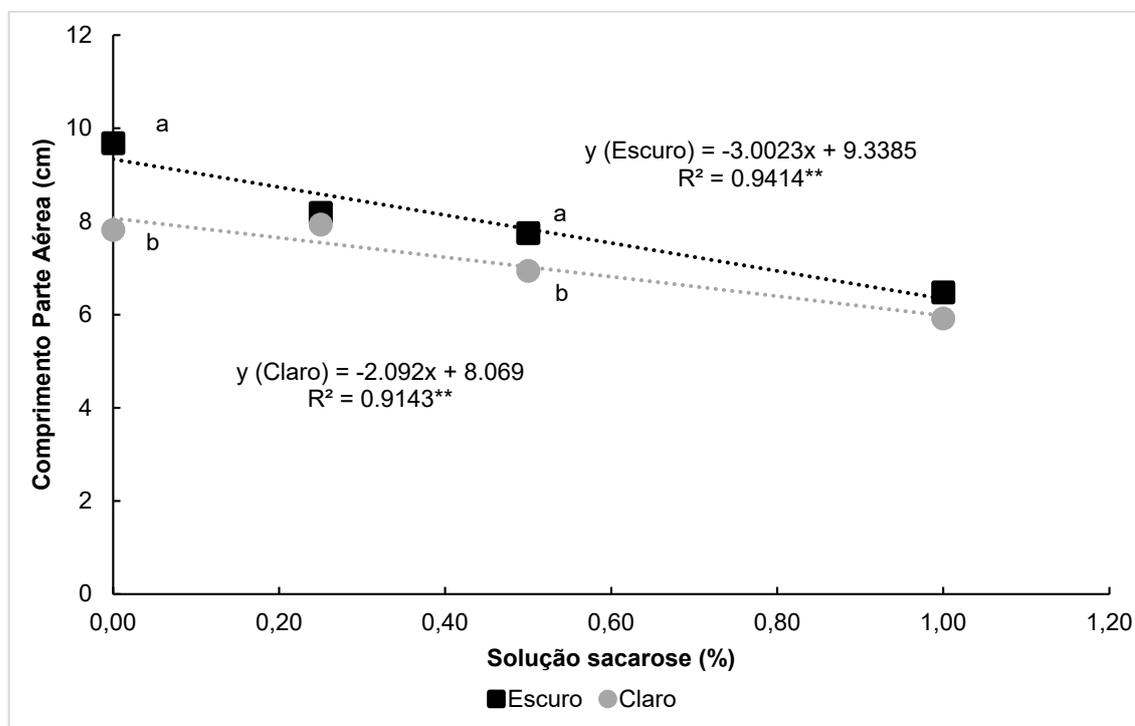
dos brotos de feijão mungo, corroborando com os resultados verificados neste trabalho.

O crescimento dos brotos de trigo sarraceno foi significativamente afetado pelo tratamento com sacarose, assim como foram observados decréscimos no peso e na altura dos brotos de trigo sarraceno em função das concentrações de sacarose (Jeong *et al.*, 2018).

Tan *et al.* (2022), mostram que estudos realizados com brotos de ervilha revelaram que a sacarose a 10 mg L^{-1} aumentou os teores de massa fresca, vitamina C, proteína solúvel, açúcar solúvel, frutose, glicose e sacarose.

Verificamos, por intermédio do Figura 15, que ambos os brotos, produzidos no escuro ou no claro tiveram um ajuste linear decrescente, em função das doses aplicadas, porém, os brotos produzidos no escuro apresentaram maiores comprimentos da parte aérea (cm).

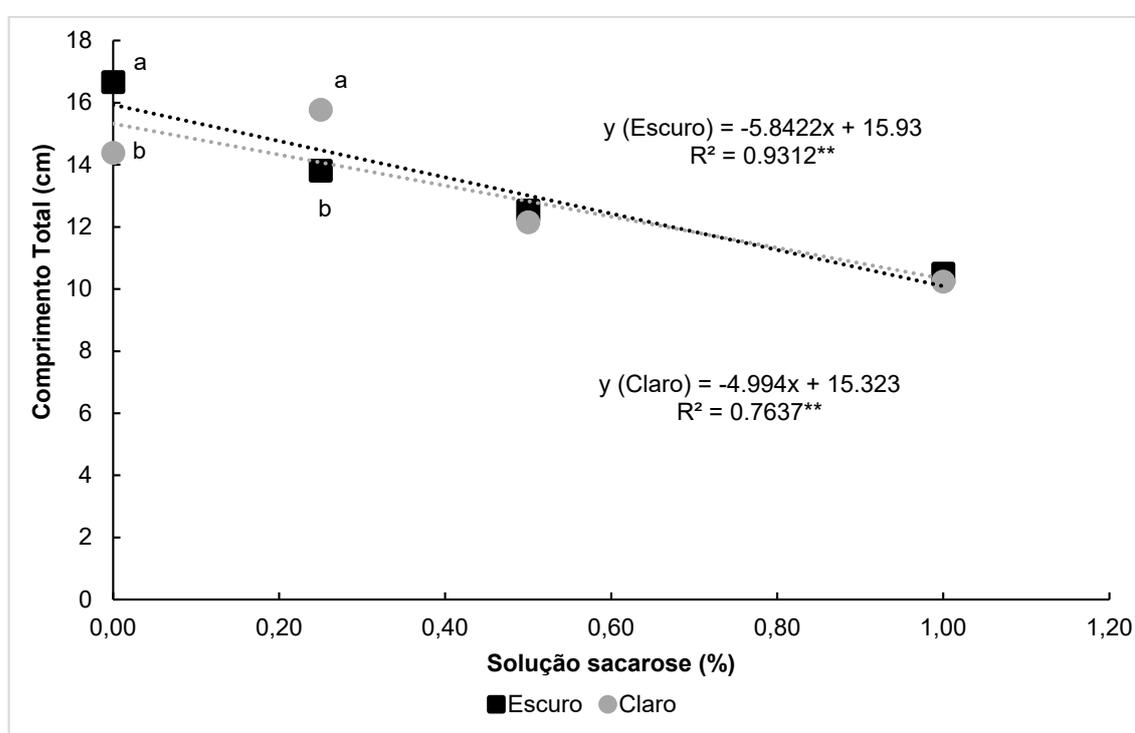
Figura 15 - Desdobramento da interação entre as Condições para Comprimento da Parte Aérea (cm). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

A Figura 16 nos aponta que ambos os tratamentos, conduzidos no escuro ou no claro, propiciaram um crescimento total do broto com um ajuste linear decrescente, em função das doses aplicadas, porém, os brotos produzidos no escuro apresentaram maiores comprimentos da parte aérea (cm) até a dosagem de 0,7156%, quando os brotos produzidos no claro tenderam a ficar maiores.

Figura 16 - Desdobramento da interação entre as Condições para Comprimento Total (cm). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

A Tabela 8, apresenta os resultados bioquímicos alcançados quando da produção de brotos utilizando solução de sacarose, A concentração inibitória (IC%) diferiu estatisticamente quando os brotos foram produzidos no claro.

Tabela 8 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (PRX), proteína solúvel (PROT), atividade antioxidante (AA), concentração inibitória (IC50) e conteúdo total de fenóis (FE) e flavonoides (FLA) em brotos de feijão mungo-verde tratados com solução de sacarose.

Tratamentos	SOD	PRX	PROT	AA	IC50	FE	FLA
Condição (A)							
Escuro	0,00836	1,6400	5,5000	44,7000	1,3860	3379	1779
Claro	0,00814	1,7600	5,6000	65,8000	0,7720	2977	1450
Dose % (B)							
0,00	0,01062	1,7400	4,4000	45,7000	1,1500	2953	1719
0,25	0,00845	1,4000	5,4000	54,3000	0,9840	3761	1702
0,50	0,00775	2,0700	5,8000	63,7000	0,7580	3141	1473
1,00	0,00616	1,6000	6,7000	57,3000	1,4230	2856	1565
	L ¹	ns	L ²	Q ³	ns	ns	ns
Valores de F							
A	0,0580 ns	0,1460 ns	0,0980 ns	28,5430 **	11,9870 **	2,1260 ns	7,4650 *
B	4,2380 *	0,7280 ns	3,8360 *	3,629 *	2,4900 ns	2,1770 ns	0,9400 ns
A*B	0,7510 ns	0,1740 ns	0,5580 ns	6,806 **	4,4610 ns	0,6390 ns	7,1510 **

Fonte: O autor.

Unidades: SOD uni (mg proteína⁻¹); PRX nmol of H₂O₂ (mg protein)⁻¹ min⁻¹; PROT mg gMS⁻¹; AA %; IC50 mg extrato graxo mL⁻¹;

Fenóis Totais e Flavonoides Totais mg (100 g extrato graxo)⁻¹,

¹L SOD = 0,010072 - 0,004172x R² = 0,9257**

²L PROT = 4,629421 + 2,115384x R² = 0,9584**

³Q AA = 44,903 + 56,616 x - 43,972 x² R²=0,9587*

O experimento demonstra o desdobramento da interação entre condições para as variáveis AA e FLA.

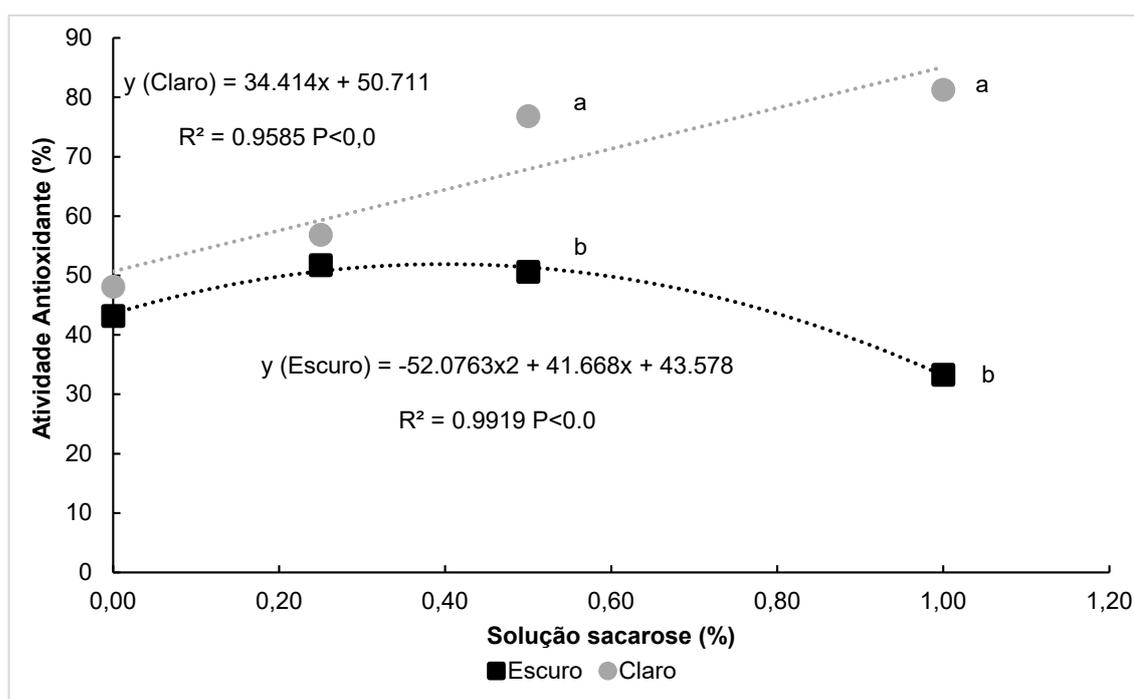
Os resultados apresentados neste trabalho, corroboram com os de Wei *et al.* (2019), quando sementes de feijão mungo foram embebidas em solução de sacarose 0,5 g/L por 24 horas a 25°C e pulverizadas com esta solução a cada 12 horas durante a germinação durante 5 dias. O conteúdo fenólico total e as atividades de superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase foram significativamente maiores nos brotos de feijão mungo tratados com sacarose do que nos controles, o que contribuiu para a maior atividade antioxidante nos brotos tratados com sacarose, demonstrando que o tratamento com sacarose exógena aumenta o teor de vitamina C, fenólicos totais e aumenta a atividade antioxidante nos brotos de feijão mungo.

De acordo com Yu *et al.* (2023), as capacidades antioxidantes também foram significativamente maiores nos brotos tratados com sacarose do que nos brotos controle, corroborando com os resultados obtidos. Segundo o autor, a aplicação elicitora de sacarose a 3% durante a brotação do feijão mungo pode ser uma estratégia eficaz para melhorar a composição fitoquímica da dieta e proporcionar potenciais benefícios à saúde.

Lyu *et al.*, (2022), verificaram, em brotos de feijão mungo-verde, que o conteúdo e a composição dos compostos fenólicos foram significativamente alterados por 1‰ e 5‰ de sacarose, respectivamente. Em resumo, os brotos de feijão mungo são fontes promissoras de compostos fenólicos na dieta e o tratamento com sacarose é um bom processo para produzir brotos de feijão mungo ricos em fenólicos.

A Figura 17 apresenta o desdobramento da interação entre as condições para a atividade antioxidante (AA). No claro, a AA (%) apresentou ajuste linear crescente, aumentando conforme era aumentada a concentração da solução de sacarose. Quando o broto foi conduzido no escuro, a atividade antioxidante sempre foi inferior ao produzido no claro, tendo pico máximo com a concentração de 0,40 %.

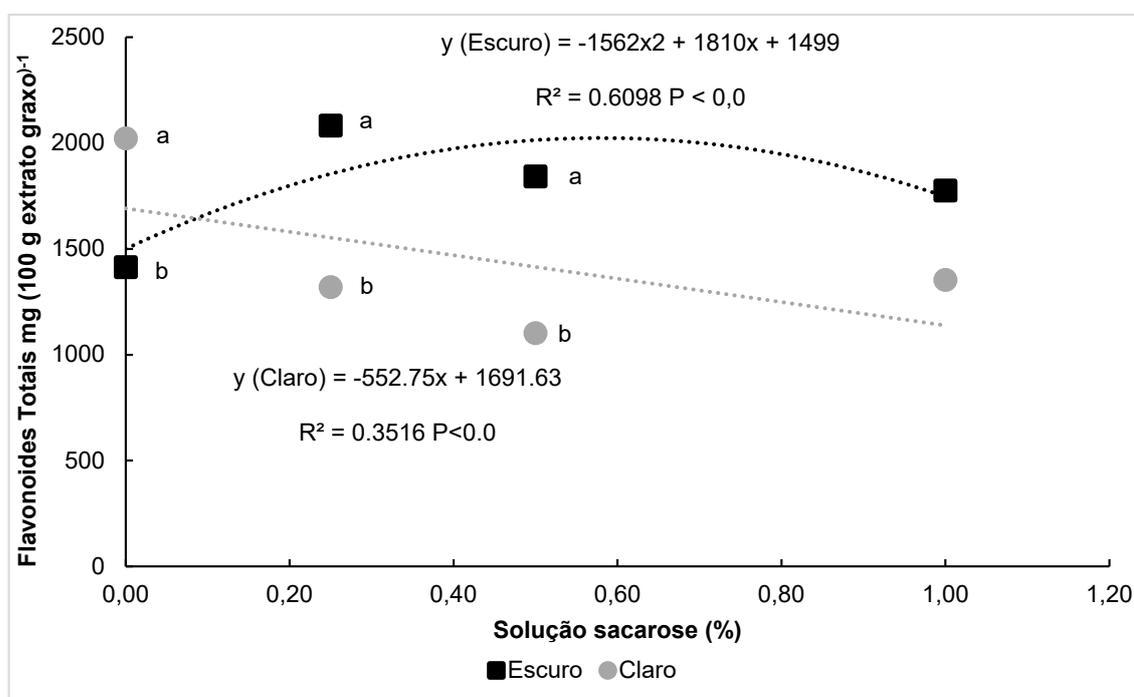
Figura 17 - Desdobramento da interação entre as Condições para Atividade Antioxidante (%). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

Verificamos, por meio da Figura 18 o desdobramento da interação entre as condições para a Flavonoides Totais ($\text{mg (100 g extrato graxo)}^{-1}$). A atividade dos FLA, embora parta de valor superior, quando conduzido no claro, apresentou ajuste linear decrescente, diminuindo conforme se aumentou a concentração da solução de sacarose. Quando o broto foi conduzido no escuro, a atividade antioxidante mostrou-se inferior à testemunha, inicialmente, aumentando em função da dosagem aplicada (%), alcançando pico máximo para concentração de 0,58%.

Figura 18 - Desdobramento da interação entre as condições para Flavonoides Totais ($\text{mg (100 g extrato graxo)}^{-1}$). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

Foi verificado por Wei *et al.* (2019), que em sementes de feijão mungo embebidas em solução de sacarose $0,5 \text{ g L}^{-1}$ por 24 horas a 25°C e pulverizadas com esta solução a cada 12h durante a germinação, o conteúdo fenólico total e as atividades da superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase foram significativamente maiores do que nos controles, o que contribuiu para a maior atividade antioxidante nos brotos tratados com sacarose.

Wei *et al.* (2019), apontaram que o conteúdo fenólico total e as atividades da superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase foram significativamente

maiores nos brotos de feijão mungo tratados com sacarose do que nos controles, o que contribuiu para a maior atividade antioxidante nos brotos tratados com sacarose,

6.4 Solução salina

A aplicação de doses de solução salina (Tabela 9), demonstra que os parâmetros CPA, CT e MSR diferiram estatisticamente do controle, quando produzidos no escuro, assim como a R R/PA e MSPA diferiram quando produzidos no claro. Na luz, as partes aéreas foram mais curtas, o que era esperado. O CR não foi afetado estatisticamente pela salinidade, assim como a MST.

Tabela 9 - Comprimento de parte aérea (CPA, cm), comprimento de raiz (CR, cm), comprimento total (CT, cm), relação raiz/parte aérea em comprimento (R R/PA), massa seca de parte aérea (MSPA, g), massa seca de raiz (MSR, g) e massa seca total (MST, g) de brotos de feijão mungo-verde tratados com solução salina.

Tratamentos	CPA	CR	CT	R R/PA	MSPA	MSR	MST
Condição (A)							
Escuro	7,9300	4,9600	12,8900	0,6400	0,5464	0,1491	0,6955
Claro	5,6100	4,9800	10,5800	0,9000	0,5979	0,0484	0,6463
Dose mM (B)							
0	8,2000	5,2200	13,4000	0,6500	0,5443	0,0973	0,6415
25	6,6800	4,8100	11,5000	0,7400	0,5868	0,0961	0,6829
50	6,7400	4,9200	11,7000	0,7700	0,5914	0,1000	0,6914
75	5,4500	4,9200	10,4000	0,9200	0,5661	0,1018	0,6679
	L ¹	ns	L ²	L ³	ns	ns	ns
Valores de F							
A	192,9140 **	0,0030 ns	30,2560 **	51,9010 **	5,9940 *	198,3030 **	3,9320 ns
B	45,2410 **	0,3400 ns	9,0050 **	9,4810 **	1,0530 ns	0,1280 ns	0,7780 ns
A*B	5,2930 **	1,7700 ns	2,9600 ns	0,0370 ns	0,5430 ns	0,7260 ns	0,2000 ns

Fonte: O autor.

¹L CPA= 7,9947 - 0,03273 x R² = 0,8829 **

²L CT = 13,0788 - 0,0358 x R² = 0,8467 **

³L R R/PA = 0,6423 + 0,0034 x R² = 0,9229 **

Koodkaew (2019), realizou estudos com brotos de feijão mungo para avaliar o efeito de soluções salinas (1, 10, 50, 100 mM), e verificou que embora o peso fresco do broto tenha diminuído significativamente com os tratamentos com 100 mM de NaCl, esse resultado sugere que concentrações de NaCl inferiores a 100 mM, foram os tratamentos apropriados para melhorar a maioria das propriedades promotoras da saúde.

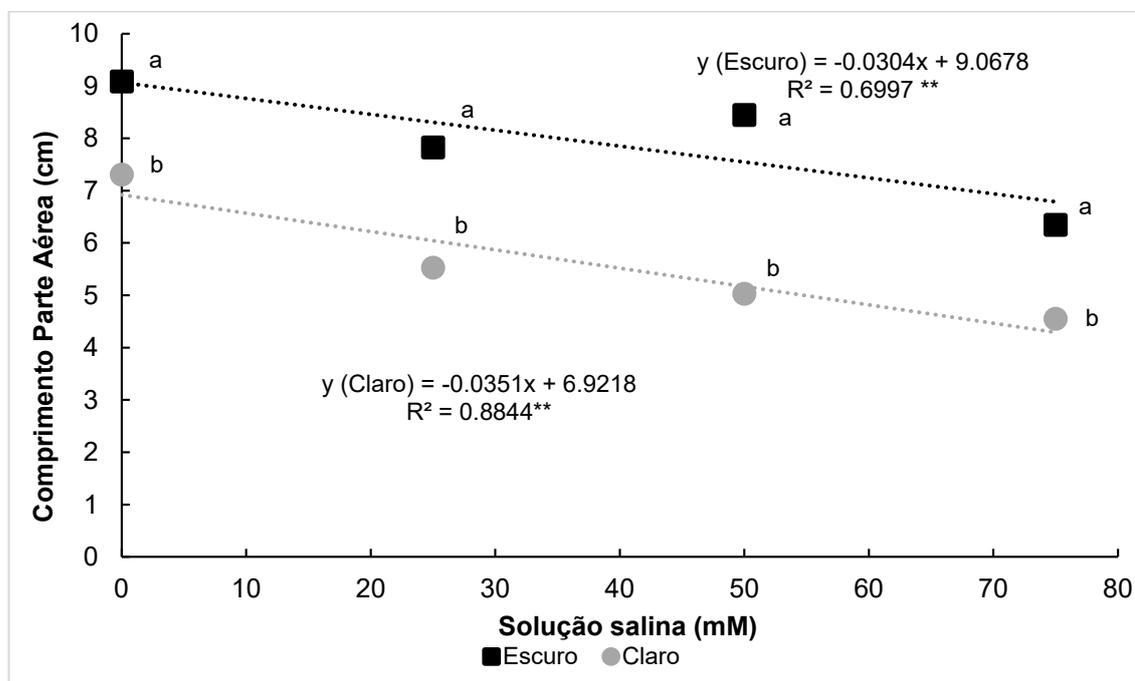
De acordo com os trabalhos de Aazami, Rasouli e Ebrahimzadeh (2021), quando estudaram efeitos oxidativos, mecanismo antioxidante e expressão gênica em tomates sob estresse salino, os resultados mostraram que o aumento do estresse salino no meio diminuiu a porcentagem de germinação, massa fresca e seca da parte aérea e comprimento da raiz.

Benincasa *et al.* (2020), observam que os brotos de milho germinados em água ou solução salina de concentração 25 mM foram coletados sete dias após a semeadura (DAS), enquanto brotos germinados em solução salina com concentração de 50 mM foram coletados oito DAS, porque o aumento da salinidade retardou ligeiramente o crescimento das mudas.

Santos *et al.* (2022), verificaram que em plantas submetidas à salinidade, um mecanismo de ajuste osmótico é iniciado para manter a turbidez das células, resultando no crescimento lento das plantas estressadas.

Houve o desdobramento da interação entre as condições para Comprimento da Parte Aérea (CM), conforme aponta a Figura 19. O CPA dos brotos conduzidos no escuro foi maior em todos os tratamentos, e sempre superior aos brotos conduzidos no claro. Em ambos os casos, claro ou escuro, o ajuste foi linear decrescente.

Figura 19 - Desdobramento da interação entre as condições para Comprimento da Parte Aérea (cm). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



Fonte: O autor.

A Tabela 10 demonstra que a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi maior para os brotos conduzidos no escuro.

Tabela 10 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (PRX), proteína solúvel (PROT), atividade antioxidante (AA), concentração inibitória (IC50) e conteúdo total de fenóis (FE) e flavonoides (FLA) em brotos de feijão mungo-verde tratados com solução salina.

Tratamentos	SOD	PRX	PROT	AA	IC50	FE	FLA
Condição (A)							
Escuro	0,0093	1,8600	5,6000	41,9000	1,4300	2850	1333
Claro	0,0062	1,6700	7,1000	43,1000	1,4730	3216	1300
Dose mM (B)							
0	0,0106	1,7400	4,4000	45,7000	1,150	2953	1719
25	0,0059	1,6700	7,1000	44,1000	1,469	3145	1236
50	0,0071	1,7500	7,0000	40,2000	1,561	2833	1373
75	0,0072	1,9100	7,0000	40,0000	1,625	3200	940
	Q ¹	ns	ns	ns	ns	ns	L ²
Valores de F							
A	11,9180**	0,2420 ns	4,0550 ns	0,1190 ns	0,0560 ns	2,0750 ns	0,0990 ns
B	5,0760*	0,0670 ns	2,9880 ns	0,6640 ns	1,3450 ns	0,4490 ns	9,3640 **
A*B	0,6400 ns	0,5130 ns	1,3960 ns	1,1100 ns	2,0080 ns	1,0330 ns	6,828000**

Fonte: O autor.

Unidades: SOD uni (mg proteína⁻¹); PRX nmol of H₂O₂ (mg protein)⁻¹ min⁻¹; PROT mg gMS⁻¹; AA %; IC50 mg extrato graxo mL⁻¹;

Fenóis Totais e Flavonoides Totais mg (100 g extrato graxo)⁻¹,

¹Q SOD = 0,0103 - 0,0002 x + 0,000002 x² R² = 0,8106 P<0,016

²L FLA = 1646,7 - 8,7984 x R² = 0,7718 **

A maior quantidade de flavonóides e ácido ascórbico, bem como atividade de eliminação de radicais foram registrados em NaCl 100 mM (Koodkaew, 2019).

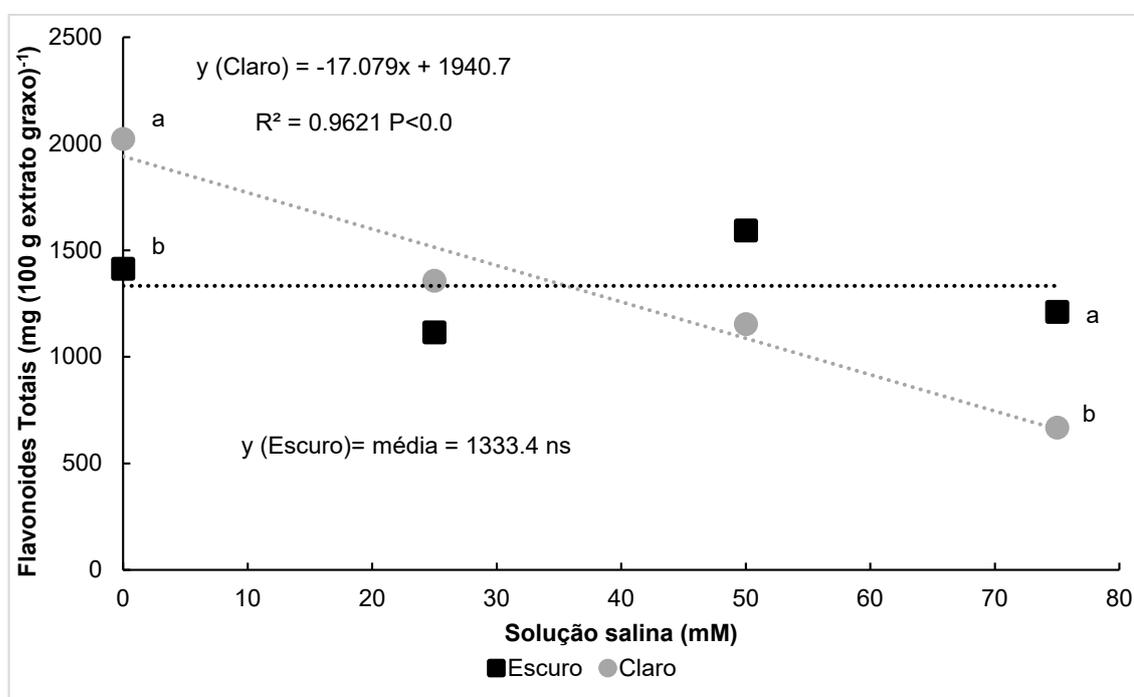
Yuan *et al.* (2010), perceberam que o teor de compostos fenólicos e glucosinolatos em 3 a 5 dias de idade, os brotos de rabanete aumentaram quando expostos ao estresse de salinidade (100 mM). Pelo contrário, Hassini *et al.* (2017) indicou um efeito negativo da salinidade no teor de glucosinolatos em brotos de brócolis e repolho com 10 dias de idade.

De forma geral, Amitrano *et al.* (2020), verificaram que diferentes regimes de umidade relativa (UR), induziram principalmente modificações morfoanatômicas, enquanto a presença/ausência de luz alterou o conteúdo de compostos antioxidantes. Os resultados gerais sugeriram que a UR e a luz, já nos estágios iniciais de

desenvolvimento, afetam o valor nutricional da planta. Portanto, a combinação de luz e baixa UR permite a produção de brotos de feijão mungo ricos em antioxidantes para serem utilizados como suplemento alimentar.

A Figura 20 demonstra o desdobramento da interação entre as condições para Flavonoides Totais ($\text{mg (100 g extrato graxo)}^{-1}$). Embora a quantidade de FLA tenha sido superior para os brotos produzidos no claro, inicialmente, ela passa a ser menor a partir da concentração de 35,55 mM de solução salina.

Figura 20 – Desdobramento da interação entre as condições para Flavonoides Totais ($\text{mg (100 g extrato graxo)}^{-1}$). (Dentro de cada dose, letras distintas indicam diferença de médias significativa a 5% pelo teste F.)



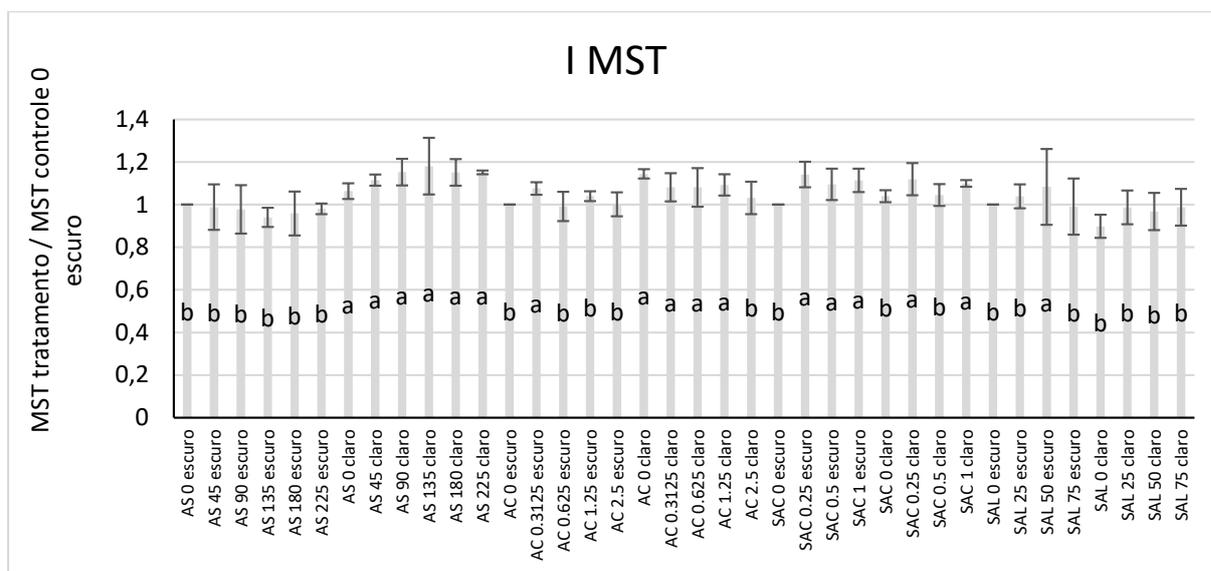
Fonte: O autor.

6.5 Análise dos índices

O ganho de matéria seca, importante para o produtor do broto, está representado na Figura 21. Houve ganho de produtividade e diferiram estatisticamente os tratamentos com AS produzidos no claro, assim como para a dosagem de AC a $0,3125 \text{ g L}^{-1}$ produzido no escuro. Fato semelhante se repetiu com os brotos produzidos no claro, utilizando o elicitor AC nas dosagens $0,3125$; $0,625$ e $1,25 \text{ g L}^{-1}$, que também diferiram estatisticamente dos demais. Ainda, apresentaram ganho na produtividade, os brotos produzidos no escuro, usando a dosagem de solução de

sacarose a 0,25; 0,5 e 1%, assim como os brotos produzidos no claro a 0,25 e 1% e os brotos produzidos em solução salina a 50 mM.

Figura 21 - Índice de matéria seca total (I MST) de brotos de feijão submetidos a diferentes concentrações, elicitores e condição de crescimento no escuro e no claro. Ácido Salicílico (AS 0; 45; 90; 135; 180 e 225 mg.L⁻¹), Ácido Ascórbico (AC 0; 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5 g.L⁻¹), Sacarose (SAC 0; 0.25; 0.5; 1%), solução salina (SAL 0; 25; 50; 75 mM).



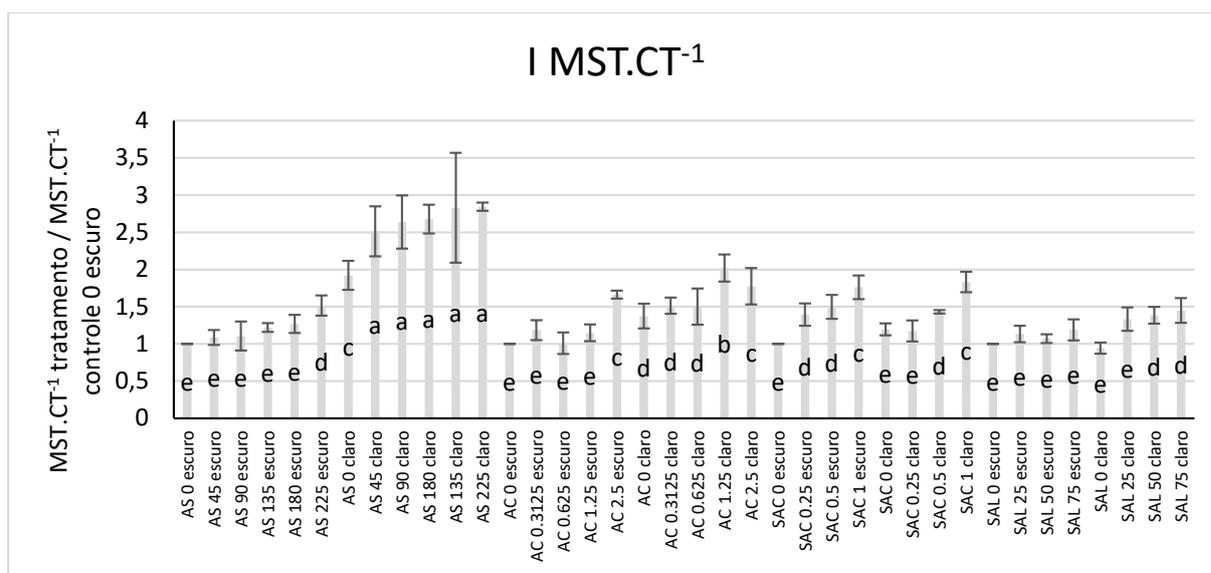
Fonte: O autor.

Colunas seguidas por letras distintas indicam grupos diferentes de médias por Scott-Knott ($P \leq 0.05$). Barras acima das colunas indicam o desvio padrão médio.

Mastropasqua, Dipierro e Paciolla (2020), quando estudaram rabanetes, soja, feijão mungo-verde e brotos de abóbora, verificaram que o tratamento escuro evitou a diminuição da matéria seca devido à iluminação, enquanto a luz vermelha induziu aumento de polifenóis na soja, diferindo em sua maioria com relação aos resultados obtidos neste trabalho, pois exceto para as aplicações, no escuro, dos elicitores que seguem: AC (0,3125 g.L⁻¹), SAC (0,25 e 0,5 %) e solução salina (50 mM), todos os outros resultados que diferiram estatisticamente foram produzidos no claro.

A Figura 22, trata do índice da matéria seca total em função do comprimento total. Brotos tratados com o elicitador AS, no claro, diferiram estatisticamente dos demais, apresentando concentração de massa por comprimento superior à 100%, quando comparados às testemunhas, o que pode sugerir que tenha havido mudanças nas propriedades de textura e maciez em relação ao controle, embora não tenha sido feito um teste organoléptico.

Figura 22 - Índice de matéria seca total por comprimento total (I MST. CT-1) de brotos de feijão submetidos a diferentes concentrações, elicitores e condição de crescimento no escuro e no claro. Ácido Salicílico (AS 0; 45; 90; 135; 180 e 225 mg.L⁻¹), Ácido Ascórbico (AC 0; 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5 g.L⁻¹), Sacarose (SAC 0; 0.25; 0.5; 1%), solução salina (SAL 0; 25; 50; 75 mM).

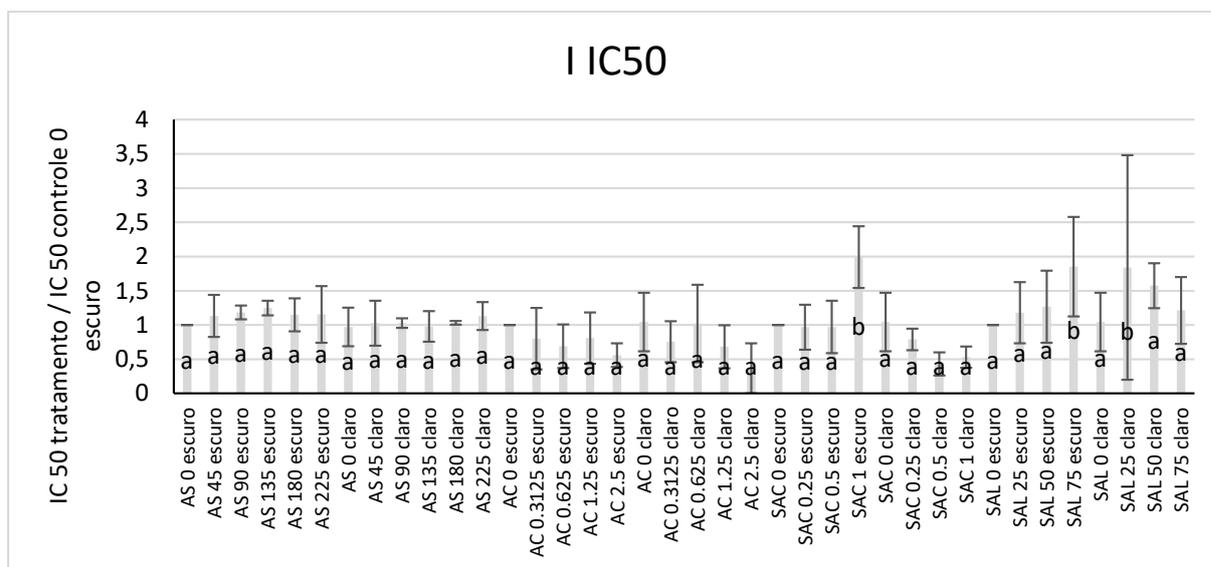


Fonte: O autor.

Colunas seguidas por letras distintas indicam grupos diferentes de médias por Scott-Knott ($P \leq 0.05$). Barras acima das colunas indicam o desvio padrão médio.

A Figura 23 apresenta o índice de concentração inibitória (IC 50), que é, a concentração do extrato, em mg de extrato graxo, capaz de reduzir 50% da concentração inicial de DPPH. Verificou-se que não houve diferenciação estatística, excetuando-se os tratamentos com sacarose 1% no escuro, solução salina 75 mM no escuro e 25 mM no claro, que foram menos eficientes.

Figura 23 - Índice de concentração inibitória (I IC50) de brotos de feijão submetidos a diferentes concentrações, elicitores e condição de crescimento no escuro e no claro. Ácido Salicílico (AS 0; 45; 90; 135; 180 e 225 mg.L⁻¹), Ácido Ascórbico (AC 0; 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5 g.L⁻¹), Sacarose (SAC 0; 0.25; 0.5; 1%), solução salina (SAL 0; 25; 50; 75 mM).

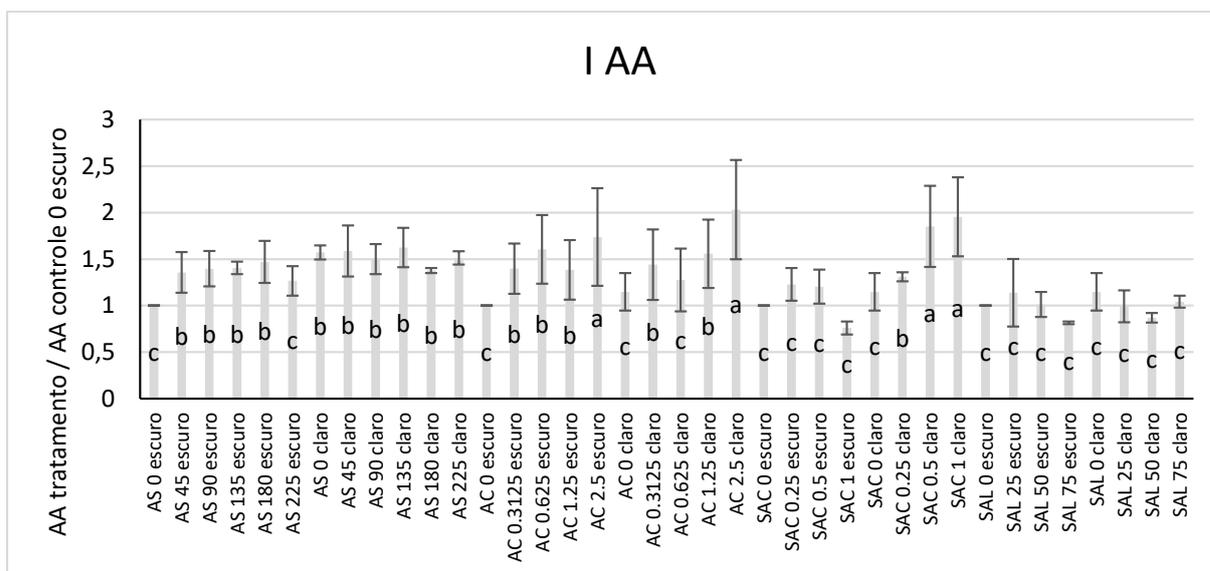


Fonte: O autor.

Colunas seguidas por letras distintas indicam grupos diferentes de médias por Scott-Knott ($P \leq 0.05$). Barras acima das colunas indicam o desvio padrão médio.

Os índices referentes às atividades antioxidante, que diferiram estatisticamente foram os referentes aos tratamentos AC 2,5 g L⁻¹ (escuro e claro) e SAC 0,5 e 1% no claro (Figura 24). A atividade antioxidante das testemunhas (representada pela letra "c"), não diferiu estatisticamente de vários dos tratamentos quando se utilizou solução salina.

Figura 24 - Índice de atividade antioxidante (I AA) de brotos de feijão submetidos a diferentes concentrações, elicitores e condição de crescimento no escuro e no claro. Ácido Salicílico (AS 0; 45; 90; 135; 180 e 225 mg.L⁻¹), Ácido Ascórbico (AC 0; 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5 g.L⁻¹), Sacarose (SAC 0; 0.25; 0.5; 1%), solução salina (SAL 0; 25; 50; 75 mM).



Fonte: O autor.

Colunas seguidas por letras distintas indicam grupos diferentes de médias por Scott-Knott ($P \leq 0.05$). Barras acima das colunas indicam o desvio padrão médio

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto aos **parâmetros biométricos de crescimento**, os elicitores aplicados em concentrações maiores afetaram negativamente o crescimento dos brotos, o que não é interessante comercialmente.

Para os **parâmetros bioquímicos**, verificamos que a aplicação exógena dos elicitores propiciou estímulos às funções antioxidantes em brotos de feijão, com exceção da solução salina.

No comparativo entre as doses, para a atividade antioxidante, os tratamentos que se sobressaíram ocorreram para a AC a 2,5 g.L⁻¹ produzidos no claro e no escuro e para dosagens de SAC de 0,5 a 1% produzidos no claro, sem que houvesse grandes modificações na concentração de massa por comprimento do broto. Houve aumento em mais de 50% na atividade antioxidante, com ganho de densidade dos brotos inferior a 100% e aumento na produção de matéria seca de 0,3 a 1%.

O trabalho buscou identificar resultados que possibilitassem a produção de um produto comercial, que tivesse um valor agregado em função de uma maior atividade antioxidante. Estes seriam brotos que poderiam ser produzidos sem mudança no rendimento de colheita do produtor e com ganho funcional significativo utilizando elicitores acessíveis – ácido ascórbico e sacarose. Importante frisar que existe um mercado específico que se propõe a consumir tais produtos, com valores agregados.

8 CONCLUSÃO

Para a produção de brotos de feijão mungo, com maior capacidade antioxidante, utilizar ácido ascórbico a 2,5 g.L⁻¹ produzidos no claro ou no escuro e sacarose a 0,5 e 1% produzidos no claro.

REFERÊNCIAS

- AAZAMI, M. A.; RASOULI, F.; EBRAHIMZADEH, A. Oxidative damage, antioxidant mechanism and gene expression in tomato responding to salinity stress under in vitro conditions and application of iron and zinc oxide nanoparticles on callus induction and plant regeneration. **BMC Plant Biology**, v. 21, n. 1, p. 597, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03379-7>
- ABBAS, S.; LATIF, H. H.; ELSHERBINY, E. A. Effect of 24-epibrassinolide on the physiological and genetic changes on two varieties of pepper under salt stress conditions. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 4, p. 1273-1284, 2013.
- AHMAD, N; ZUO, Y.; LU, X.; ANWAR, F.; HAMEED, S. Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. **Food Chemistry**, v. 190, p. 80-89, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.077>
- ALCALDE, M. A.; PEREZ-MATAS, E.; ESCRICH, A.; CUSIDO, R. M.; PALAZON, J.; BONFILL, M. Biotic elicitors in adventitious and hairy root cultures: a review from 2010 to 2022. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 5253, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27165253>
- AMITRANO, C.; ARENA, C.; DE PASCALE, S.; DE MICCO, V. Light and low relative humidity increase antioxidants content in mung bean (*Vigna radiata* L.) sprouts. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1093, 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9091093>
- AMITRANO, C. V., E.; DE MICCO, V.; ARENA, C. Light fertilization affects growth and photosynthesis in mung bean (*Vigna radiata*) plants. **Journal of Environmental Accounting and Management**, v. 6, n. 4, p. 295-304, 2018. 10.5890/JEAM.2018.12.002
- ARAÚJO, F. F. D.; BETTIOL, W. Supressividade dos nematoides *Meloydogine javanica* e *Heterodera glycines* em soja por adição de lodo de esgoto ao solo. **Ciência Rural**, v. 35, p. 806-812, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000400009>
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Biology**, v. 50, n. 1, p. 601-639, 1999. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.601>
- AZMAT, A.; YASMIN, H.; HASSAN, M. N.; NOSHEEN, A.; NAZ, R.; SAJJAD, M.; AKHTAR, M. N. Co-application of bio-fertilizer and salicylic acid improves growth, photosynthetic pigments and stress tolerance in wheat under drought stress. **PeerJ Publishing**, v. 8, p. e9960, 2020. <https://doi.org/10.7717/peerj.9960>
- BABUSHKIN, V. A.; PERFILOVA, O. V.; VINNITSKAYA, V. F.; DANILIN, S. I. Expansion of food products range for functional and prophylactic nutrition with usage of fruits and vegetables of Tambov region. **Ecology, Environment and Conservation**, v. 21, p. AS29-AS36, 2015.

BAENAS, N.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MORENO, D. A., Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in Brassicaceae sprouts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 8, p. 1881-1889, 2014. <https://doi.org/10.1021/jf404876z>

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. D. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, p. 453-460, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>

BHASKAR, R.; XAVIER, L. S. E.; UDAYAKUMARAN, G.; KUMAR, D. S.; VENKATESH, R.; NAGELLA, P. Biotic elicitors: a boon for the in-vitro production of plant secondary metabolites. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 149, n. 1-2, p. 7-24, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02131-1>

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ORTUÑO, A. D. R. J.; DEL RIO, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L, leaves. **Food Chemistry**, v. 68, p. 457-462, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00221-6)

BENINCASA, P.; D'AMATO, R.; FALCINELLI, B.; TRONI, E.; FONTANELLA, M. C.; FRUSCIANTE, S.; DIRETTO, G. Grain endogenous selenium and moderate salt stress work as synergic elicitors in the enrichment of bioactive compounds in maize sprouts. **Agronomy**, v. 10, n. 5, p. 735, 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050735>

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. *In: Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. CRC Press, 2010. p. 1-30.

BILSKA, K.; WOJCIECHOWSKA, N.; ALIPOUR, S.; KALEMBA, E. MAscorbic acid: the little-known antioxidant in woody plants. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, p. 645, 2019. <https://doi.org/10.3390/antiox8120645>

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199- 1200, 1958. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>

BOEING, J. S.; BARIZÃO, É. O.; SILVA, B. C.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. C.; VISENTAINER, J. V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 48, 2014. <https://doi.org.ez259.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s13065-014-0048-1>

BOGUE, J.; COLLINS, O.; TROY, A. J. Market analysis and concept development of functional foods. *In: Developing new functional food and nutraceutical products*. Academic Press, 2017. p. 29-45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802780-6.00002-X>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical**

Biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de Sementes**, Brasília: SNDA/ DNDV/CLAV, 2009.

CAMM, E. L.; TOWERS, G. H. N. Phenylalanine ammonia lyase. **Phytochemistry**, v. 12, p. 961–973, 1973. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)85001-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)85001-0)

CARDEÑOSA, V.; MEDRANO, E.; LORENZO, P.; SÁNCHEZ-GUERRERO, M. C.; CUEVAS, F.; PRADAS, I.; MORENO-ROJAS, J. M. Effects of salinity and nitrogen supply on the quality and health-related compounds of strawberry fruits (*fragaria* × *ananassa* cv, Primoris). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 14, p. 2924-2930, 2015. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7034>

CARILLO, P.; SOTERIOU, G. A.; KYRIACOU, M. C.; GIORDANO, M.; RAIMONDI, G.; NAPOLITANO, F.; ROUPHAEL, Y. Regulated salinity eustress in a floating hydroponic module of sequentially harvested lettuce modulates phytochemical constitution, plant resilience, and post-harvest nutraceutical quality. **Agronomy**, v. 11, n. 6, p. 1040, 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061040>

CHANDRA, A.; ANAND, A.; DUBEY, A. Effect of salicylic acid on morphological and biochemical attributes in cowpea. **Journal of Environmental Biology**, v. 28, n. 2, p. 193-196, 2007.

CHEN, L.; WU, J. E.; LI, Z.; LIU, Q.; ZHAO, X.; YANG, H. Metabolomic analysis of energy regulated germination and sprouting of organic mung bean (*Vigna radiata*) using NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 286, p. 87-97, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.183>

CHON, S. U. Total polyphenols and bioactivity of seeds and sprouts in several legumes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 34, p. 6112-6124, 2013. <https://doi.org/10.2174/1381612811319340005>

COLLA, G.; KIM, H. J.; KYRIACOU, M. C.; ROUPHAEL, Y. Nitrate in fruits and vegetables. **Scientia Horticulturae**, v. 237, p. 221-238, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.016>

COUTINHO, C. S.; ROCHA, E. S. N.; SILVA, D. I. L.; FREIRE, A. I. Avaliação de crescimento de plântula de feijão Mungo-verde em diferentes substratos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e58611730675-e58611730675, 2022.

DI GIOIA, F.; RENNA, M.; SANTAMARIA, P. Microgreens and “baby leaf” vegetables. *In: Minimally processed refrigerated fruits and vegetables*. Estados Unidos: Springer, 2017. p. 411-428.

DÍAZ, L. D.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M. An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103896, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103896>

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, p. 29-41, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.018>

SANTOS, T. B.; RIBAS, A. F.; SOUZA, S. G. H.; BUDZINSKI, I. G. F.; DOMINGUES, D. S. Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: a review. **Stresses**, v. 2, n.1, p. 113-135, 2022. <https://doi.org/10.3390/stresses2010009>

DUARTE, M.; SILVA, V. L. D.; PACHECO, A. C.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Productivity and antioxidant activity of mung bean sprouts (*Vigna radiata* L.) mediated by some elicitors. **Ciência Rural**, v. 53, p. e20210797, 2023. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210797>

EDREVA, A.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T.; DAGNON, S.; GÜREL, A.; AKTAŞ, L.; GESHEVA, E. Stress protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. **General and Applied Plant Physiology**, v. 34, n. 1-2, p. 67-78, 2008.

EL-ADAWY, T. A.; RAHMA, E. H.; EL-BEDAWEY, A. A.; EL-BELTAGY, A. E. Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 58, p. 1-13, 2003. <https://doi.org/10.1023/B:QUAL.0000040339.48521.75>

EL-BELTAGI, H. S.; MOHAMED, I.; SOFY, M. R. Role of ascorbic acid, glutathione and proline applied as singly or in sequence combination in improving chickpea plant through physiological change and antioxidant defense under different levels of irrigation intervals. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1702, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25071702>

FERRARI, S. Biological elicitors of plant secondary metabolites: mode of action and use in the production of nutraceuticals. *In*: **Bio-farms for nutraceuticals: functional food and safety control by biosensors**. Boston, MA: Springer US, 2010. p. 152-166.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 35, p. 1039-1042, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. A importância da vitamina C através dos tempos. **Química Nova na Escola**, v. 17, p. 3-7, 2003.

GADJEV, I.; STONE, J. M.; GECHEV, T. S. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 270, p. 87-144, 2008. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01403-2](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01403-2)

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034>

GAN, R. Y.; LUI, W. Y.; WU, K.; CHAN, C. L.; DAI, S. H.; SUI, Z. Q.; CORKE, H. Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: an updated review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 59, p. 1-14, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.010>

GHONAME, A. A.; ABOU-HUSSEIN, S. D.; EL-TOHAMY, W. A. Eustress (positive stress) salinity as an enhancement tool for bioactive ingredients and quality characteristics of vegetables, a review. **Sciences**, v. 9, n. 02, p. 456-463, 2019.

GIUFFRIDA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; DUGO, G. Evaluation of carotenoid and capsaicinoid contents in powder of red chili peppers during one year of storage. **Food Research International**, v. 65, p. 163-170, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.019>

GOLKAR, P.; MORADI, M.; GAROUSI, G. A. Elicitation of Stevia glycosides using salicylic acid and silver nanoparticles under callus culture. **Sugar Tech**, v. 21, n. 4, p. 569-577, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0655-6>

GOLKAR, P.; TAGHIZADEH, M.; YOUSEFIAN, Z. The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under in vitro salinity stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 137, n. 3, p. 575-585, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01592-9>

GÓMEZ-VELÁZQUEZ, H. D. J.; APARICIO-FERNÁNDEZ, X.; REYNOSO-CAMACHO, R. Chia sprouts elicitation with salicylic acid and hydrogen peroxide to improve their phenolic content, antioxidant capacities in vitro and the antioxidant status in obese rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 363-370, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00912-9>

GRANATO, D.; BARBA, F. J.; BURSAĆ KOVAČEVIĆ, D.; LORENZO, J. M.; CRUZ, A. G.; PUTNIK, P. Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 93-118, 2020. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>

GUO, R.; YUAN, G.; WANG, Q. Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 3, p. 159-165, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.01.014>

GUO, S.; GE, Y.; JOM, K. N. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus* L.). **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0328-7>

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products from plants.

Chemicals from Plants, v. 26, p. 1-25, 1999.

https://doi.org/10.1142/9789812817273_0001

HASSINI, I.; MARTINEZ-BALLESTA, M. C.; BOUGHANMI, N.; MORENO, D. A.; CARVAJAL, M. Improvement of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* L, var, italica) growth and quality by KCl seed priming and methyl jasmonate under salinity stress.

Scientia Horticulturae, v. 226, p. 141-151, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.030>

HU, Z.; LEI, Y.; ZHANG, J.; TONG, W.; ZHANG, Y.; DU, L. Physiological characterization, antioxidant potential, and bacterial survival of soybean sprouts subjected to pre-and post-harvest low intensity ultrasound and exogenous ascorbic acid application.

Postharvest Biology and Technology, v. 198, p. 112258, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112258>

JAN, R.; ASAF, S.; NUMAN, M.; LUBNA; KIM, K. M. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions.

Agronomy, v. 11, n. 5, p. 968, 2021.

<https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro.

Food Chemistry, v. 73, n. 3, 285-290, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00298-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00298-3)

JEONG, H.; SUNG, J.; YANG, J.; KIM, Y.; JEONG, H. S.; LEE, J. Effect of sucrose on the functional composition and antioxidant capacity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprouts.

Journal of Functional Foods, v. 43, p. 70-76, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.01.019>

JING, Z.; YONGQI, Y. I. N.; JUN, T. A. O. Study on regulation of physiology and melatonin metabolism in mustard sprouts by salicylic acid.

Journal of Nuclear Agricultural Sciences, v. 36, n. 1, p. 219, 2022.

<https://www.hnxb.org.cn/EN/10.11869/j.issn.100-8551.2022.01.0219>

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J. C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W.

Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms.

Australian Journal of Crop Science, v. 5, n. 6, p. 709-725, 2011.

<https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.282079847301776>

KHAN, N.; SYEED, S.; MASOOD, A.; NAZAR, R.; IQBAL, N. Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress.

International Journal of Plant Biology,

v, 1, n, 1, p, e1-e1, 2010. <https://doi.org/10.4081/pb.2010.e1>

KIRINA, I. B.; BELOSOKHOV, F. G.; TITOVA, L. V.; SURAYKINA, I. A.; PULPITOW, V. F.

Biochemical assessment of berry crops as a source of production of functional food products.

IOP conference series: earth and environmental science, v. 548, n. 8, p. 082068,

ago. 2020. [10.1088/1755-1315/548/8/082068](https://doi.org/10.1088/1755-1315/548/8/082068)

- KONSTANTINIDI, M.; KOUTELIDAKIS, A. E. Functional foods and bioactive compounds: a review of its possible role on weight management and obesity's metabolic consequences. **Medicines**, v. 6, n. 3, p. 94, 2019.
<https://doi.org/10.3390/medicines6030094>
- KOODKAEW, I. NaCl and glucose improve health-promoting properties in mung bean sprouts. **Scientia Horticulturae**, v. 247, p. 235-241, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.022>
- KYRIACOU, M. C.; ROUPHAEL, Y. Towards a new definition of quality for fresh fruits and vegetables. **Scientia Horticulturae**, v. 234, p. 463-469, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.046>
- LE COUTEUR, P.; BURRESON, J. **Os botões de Napoleão**: as 17 moléculas que mudaram a história. Rio de Janeiro: Zahar, 343 p. 2006.
- LEFEVERE, H.; BAUTERS, L.; GHEYSEN, G. Salicylic acid biosynthesis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 338, 2020.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- LEI, Y. B.; SONG, S. Q.; FU, J. R. Possible involvement of antioxidant enzymes in the cross-tolerance of the germination/growth of wheat seeds to salinity and heat stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 10, p. 1211-1219, 2005.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00152.x>
- LIBUTTI, A.; MONTELEONE, M. Soil vs, groundwater: the quality dilemma, managing nitrogen leaching and salinity control under irrigated agriculture in Mediterranean conditions. **Agricultural Water Management**, v. 186, p. 40-50, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.02.019>
- LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonoides. **Biociencia**, v. 3, n.17, p.18-22, 2000.
- LYU, C.; ZHANG, X.; HUANG, L.; YUAN, X.; XUE, C.; CHEN, X. Widely targeted metabolomics analysis characterizes the phenolic compounds profiles in mung bean sprouts under sucrose treatment. **Food Chemistry**, v. 395, p. 133601, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133601>
- MACHADO NETO, N. B.; DURÃES, M. A. B. Physiological and biochemical response of common bean varieties treated with salicylic acid under water stress. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 269–278, 2006.
- MAITY, D.; MIJANUDDIN, M.; DREW, M. G.; MAREK, J.; MONDAL, P. C.; PAHARI, B.; ALI, M. Oxovanadium (V) complexes of bis (phenolate) ligands with acetylacetonone as co-ligand: synthesis, crystal structure, electrochemical and kinetics studies on the oxidation of ascorbic acid. **Polyhedron**, v. 26, n. 15, p. 4494-4502, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2007.06.010>

MANELA-AZULAY, M.; LACERDA, C. A. M.; PEREZ, M. A.; FILGUEIRA, A. L.; CUZZI, T. V. C. Vitamina c. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 3, p. 265-272, 2003.

MARÍN, A.; RUBIO, J. S.; MARTÍNEZ, V.; GIL, M. I. Antioxidant compounds in green and red peppers as affected by irrigation frequency, salinity and nutrient solution composition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 8, p. 1352–1359, 2009. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3594>

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; GULEWICZ, P.; GULEWICZ, K.; VIDAL-VALVERDE, C. Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 1635-1644, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.004>

MASTROPASQUA, L.; DIPIERRO, N.; PACIOLLA, C. Effects of darkness and light spectra on nutrients and pigments in radish, soybean, mung bean and pumpkin sprouts. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 558, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9060558>

MATHIEU, Y.; LAPOUS, D.; THOMINE, S.; LAURIÈRE, C.; GUERN, J. Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. **Planta**, v. 199, p. 416-424, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00195734>

MENDELSON, R.; BALICK, M. J. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. **Economic botany**, v. 49, n. 2, p. 223-228, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF02862929>

MIURA, K.; TADA, Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00004>

MORAES, F. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2006.

MORIYA, L. M.; NETO, N. B. M.; MARKS, T. R.; CUSTODIO, C. C. Seed vigour better to be assessed by physiological markers rather than expression of antioxidant enzymes in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 1, p. 30-40, 2015. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.915149566515439>

NAIR, R.; SCHREINEMACHERS, P. Global status and economic importance of mungbean. *In: The Mungbean Genome*. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 1–8. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20008-4_1

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

NAWAZ, M.; ASHRAF, M. Y.; KHAN, A.; NAWAZ, F. Salicylic Acid–and Ascorbic Acid–Induced Salt Tolerance in Mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) Accompanied by Oxidative Defense Mechanisms. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 2057-2071, 2021.

<https://doi.org/10.1007/s42729-021-00502-3>

NISHIKAWA, F.; KATO, M.; HYODO, H.; IKOMA, Y.; SUGIURA, M.; YANO, M. Effect of sucrose on ascorbate level and expression of genes involved in the ascorbate biosynthesis and recycling pathway in harvested broccoli florets. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 409, p. 65–72, 2005. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri007>

NOREEN, Z.; ASHRAF, M. Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 16, p. 1764-1774, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.005>

OKADA, A.; SHIMIZU, T.; OKADA, K.; KUZUYAMA, T.; KOGA, J.; SHIBUYA, N.; YAMANE, H. Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 65, n. 2, p. 177-187, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9207-2>

OLIVEIRA, R. S. V.; SALOMÃO, L. C.; MORGADO, H. S.; SOUSA, C. M.; OLIVEIRA, H. F. E. D. Growth and production of basil under different luminosity and water replacement levels. **Horticultura Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 324–328, 2020. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620200314>

PACHECO, A. C.; CUSTÓDIO, C. C.; MACHADO NETO, N. B.; CARVALHO, P. R.; PEREIRA, D. N.; PACHECO, J. G. E. Germinação de sementes de camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] e calêndula (*Calendula officinalis* L.) tratadas com ácido salicílico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 1, p. 61-67, 2007.

PAGARE, S.; BHATIA, M.; TRIPATHI, N.; PAGARE, S.; BANSAL, Y. K. Secondary metabolites of plants and their role: overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, n. 3, p. 293-304, 2015.

PANDEY, A. K.; LAL, E. P. Effect of salicylic acid on morphological, biochemical and antioxidant parameters of mungbean (*Vigna radiata* L.) under salt stress. **Plant Archives**, v. 18, n. 1, p. 109-116, 2018.

PASTORI, G. M.; KIDDLE, G.; ANTONIW, J.; BERNARD, S.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; VERRIER, P. J.; FOYER, C. H. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. **The Plant Cell**, v. 15, n. 4, p. 939-951, 2003. <https://doi.org/10.1105/tpc.010538>

PÉREZ-LABRADA, F.; LÓPEZ-VARGAS, E. R.; ORTEGA-ORTIZ, H.; CADENAS-PLIEGO, G.; BENAVIDES-MENDOZA, A.; JUÁREZ-MALDONADO, A. Responses of tomato plants under saline stress to foliar application of copper nanoparticles. **Plants**, v. 8, n. 6, p. 151, 2019. <https://doi.org/10.3390/plants8060151>

PETROPOULOS, S. A.; LEVIZOU, E.; NTATSI, G.; FERNANDES, Â.; PETROTOS, K.; AKOUMIANAKIS, K.; FERREIRA, I. C. Salinity effect on nutritional value,

chemical composition and bioactive compounds content of *Cichorium spinosum* L. **Food Chemistry**, v. 214, p. 129-136, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.080>

RAVINDRA, N. S.; KULKARNI, R. N. Essential oil yield and quality in rose-scented geranium: variation among clones and plant parts. **Scientia Horticulturae**, v. 184, p. 31-35, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.023>

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000200001>

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. S105-S110, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(02\)80176-1](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(02)80176-1)

ROSA, J. S.; GODOY, R. L. D. O.; OIANO NETO, J.; CAMPOS, R. D. S.; MATTA, V. M. D.; FREIRE, C. A.; SOUZA, R. S. D. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 837-846, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400025>

ROSSATTO, T.; AMARAL, M. N.; BENITEZ, L. C.; VIGHI, I. L.; BRAGA, E. J. B.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; PINTO, L. S. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants, cv, BRS AG, under saline stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, p. 865-875, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0467-2>

ROUPHAEL, Y.; PETROPOULOS, S. A.; CARDARELLI, M.; COLLA, G. Salinity as eustressor for enhancing quality of vegetables. **Scientia Horticulturae**, v. 234, p. 361–369, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.048>

ROUPHAEL, Y.; KYRIACOU, M. C. Quality and safety of fresh fruits and vegetables at harvest. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 78–79, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.006>

ROUPHAEL, Y.; KYRIACOU, M. C.; PETROPOULOS, S. A.; PASCALE, S.; COLLA, G. Improving vegetable quality in controlled environments. **Scientia Horticulturae**, v. 234, p. 275–289, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.033>

SADEGHIPOUR, O.; MONEM, R. Improving arsenic toxicity tolerance in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] by salicylic acid application. **Vegetos**, v. 34, n. 3, p. 1-8, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42535-021-00230-0>

SAKANO, K. Metabolic regulation of ph in plant cells: role of cytoplasmic ph in defense reaction and secondary metabolism. **International Review of Cytology**, v. 206, p. 1-44, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)06018-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)06018-1)

SERKEDJIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. *In*: GUPTA, S. D. **Reactive**

oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers, 2011. Chap.13, p. 275-293.

SERRANO, C.; SAPATA, M. M.; SOARES, A.; LOPES, V.; BARATA, A. M. Plantas medicinais e seu uso na alimentação saudável. **Vida Rural**, 2022.

SHAALTIEL, Y.; GRESSEL, J. Multienzyme oxygen radical detoxifying system correlated with paraquat resistance in *Coryza bonariensis*. **Pesticide biochemistry and Physiology**, v. 26, n. 1, p. 22-28, 1986. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(86\)90058-1](https://doi.org/10.1016/0048-3575(86)90058-1)

SHABALA, S.; POTTOSIN, I. Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 151, n. 3, p. 257-279, 2014. <https://doi.org/10.1111/ppl.12165>

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, n. 1, p. 217037, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>

SHASMITA, S. N. R.; RATH, S. K.; BEHERA, S.; NAIK, S. K. In vitro secondary metabolite production through fungal elicitation: an Approach for sustainability. In: PRASAD, R.; KUMAR, V.; KUMAR, M.; WANG, S. (Eds.). **Fungal nanobionics: Principles and Applications**. Singapore: Springer, 2018. p. 215–242.

SIKORA, M.; ŚWIECA, M. Effect of ascorbic acid postharvest treatment on enzymatic browning, phenolics and antioxidant capacity of stored mung bean sprouts. **Food Chemistry**, v. 239, p. 1160-1166, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.067>

SILVA, M. S.; SILVA, R. P. D.; SOUZA, A. V. L. D.; XAVIER, Y. P. M.; OLIVEIRA, A. C. D.; COQUEIRO, D. S. O. Aplicação exógena do ácido salicílico em maracujazeiro-amarelo para o controle do vírus do endurecimento dos frutos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, 2016. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000082015>

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 3, p. 229-235, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)80070-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)80070-9)

SOLFANELLI, C.; POGGI, A.; LORETI, E.; ALPI, A.; PERATA, P. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 140, n. 2, p. 637-646, 2006.

TAIZ, L. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 858 p. 2017.

TAN, C.; ZHANG, L.; DUAN, X.; CHAI, X.; HUANG, R.; KANG, Y.; YANG, X. Effects of exogenous sucrose and selenium on plant growth, quality, and sugar metabolism of pea sprouts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 7, p. 2855-2863, 2022. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11626>

TANG, D.; DONG, Y.; REN, H.; LI, L.; HE, C. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung bean and its sprouts (*Vigna radiata*). **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2014.
<https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-4>

THEPAROD, T.; HARNSOONGNOEN, S. Narrow-band light-emitting diodes (LEDs) effects on sunflower (*Helianthus annuus*) sprouts with remote monitoring and recording by Internet of things device. **Sensors**, v. 22, n. 4, p. 1503, 2022.
<https://doi.org/10.3390/s22041503>

THIPPESWAMY, T. G.; LALITHA, J.; SHINDE, M. Enhancement of ascorbic acid in processed yellow cultivar mung bean seeds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 4, n. 7, p. 253-257, 2015.
<http://dx.doi.org/10.19070/23263350-1500045>

TJANDRA NUGRAHA, D.; ZINIA ZAUUU, J. L.; AGUINAGA BÓSQEZ, J. P.; BODOR, Z.; VITALIS, F.; KOVACS, Z. Near-infrared spectroscopy and aquaphotomics for monitoring mung bean (*Vigna radiata*) sprout growth and validation of ascorbic acid content. **Sensors**, v. 21, n. 2, p. 611, 2021.
<https://doi.org/10.3390/s21020611>

WEI, Y.; WANG, X.; SHAO, X.; XU, F.; WANG, H. Sucrose treatment of mung bean seeds results in increased vitamin C, total phenolics, and antioxidant activity in mung bean sprouts. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 12, p. 4037-4044, 2019.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1269>

WOJDYŁO, A.; NOWICKA, P.; TKACZ, K.; TURKIEWICZ, I. P. Sprouts vs, microgreens as novel functional foods: variation of nutritional and phytochemical profiles and their in vitro bioactive properties. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4648, 2020.
<https://doi.org/10.3390/molecules25204648>

WU, S.; CHAPPELL, J. Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p.145-152, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.007>

XIA, X. J.; ZHOU, Y. H.; DING, J.; SHI, K.; ASAMI, T.; CHEN, Z.; YU, J. Q. Induction of systemic stress tolerance by brassinosteroid in *Cucumis sativus*. **New Phytologist**, v. 191, n. 3, p. 706-720, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03745.x>

YAO, X.; ZHU, L.; CHEN, Y.; TIAN, J.; WANG, Y. In vivo and in vitro antioxidant activity and α -glucosidase, α -amylase inhibitory effects of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds. **Food Chemistry**, v. 139, n.1-4, p. 59-66, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.045>

YU, J.; LEE, H.; HEO, H.; JEONG, H. S.; SUNG, J.; LEE, J. Sucrose-induced abiotic stress improves the phytochemical profiles and bioactivities of mung bean sprouts. **Food Chemistry**, v. 400, p. 134069, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.045>

YUAN, G.; WANG, X.; GUO, R.; WANG, Q. Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1014-1019, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.040>

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 4, p. 283-333, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>