



**JULIENE DOS REIS MOREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E  
PRODUÇÃO DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS EM *Achillea millefolium* L. APÓS  
APLICAÇÃO DE QUITOSANA**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**JULIENE DOS REIS MOREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E PRODUÇÃO DE  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *Achillea millefolium* L. APÓS  
APLICAÇÃO DE QUITOSANA**

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

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Moreira, Juliene dos Reis.

Caracterização fisiológica e produção de metabólitos secundários em *Achillea millefolium* L. após aplicação de quitosana / Juliene dos Reis Moreira . – Lavras : UFLA, 2016.

86 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Bibliografia.

1. Óleo essencial. 2. Mil-folhas. 3. Novalgina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**JULIENE DOS REIS MOREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E PRODUÇÃO DE  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *Achillea millefolium* L. APÓS  
APLICAÇÃO DE QUITOSANA**

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

APROVADA em 16 de fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery      UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves                      UFLA

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2016**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por guiar meus passos, proporcionando-me força, tranquilidade e sabedoria para passar pelos momentos difíceis. Por sua Graça e misericórdia, consegui chegar até aqui e obter esta vitória.

Aos meus familiares que me incentivaram e contribuíram para a realização deste sonho.

Ao meu orientador, prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga, pela dedicação, paciência e por todos os ensinamentos transmitidos durante o mestrado.

Aos professores da Universidade Federal de Lavras, por transmitirem seus conhecimentos e contribuírem para a minha formação pessoal e profissional.

Aos colegas do laboratório de Crescimento de Desenvolvimento de Plantas, pelo auxílio durante a execução do projeto.

Aos amigos verdadeiros, que tive o privilégio de conhecer, amizades que levarei para toda a vida e, sem dúvida, ajudaram-me, de uma forma especial, a conseguir esta conquista.

Aos funcionários do setor de Fisiologia Vegetal Joel e Odorêncio pela ajuda e disposição durante a execução do trabalho.

Ao CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Setor de Fisiologia Vegetal por proporcionar oportunidade e infraestrutura para realização desta pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A elicitação com quitosana é uma ferramenta utilizada para melhorar as respostas de defesa da planta por meio da indução das rotas do metabolismo secundário. Além disso, a aplicação adequada desse eliciador, em plantas medicinais, pode promover o aumento de compostos majoritários na composição do óleo. Contudo, faltam informações sobre quais são os principais processos fisiológicos responsáveis pelas alterações na composição do óleo. Desta forma, objetivou-se avaliar a ação da quitosana e determinar uma concentração ideal para otimizar a produção de óleo essencial em *Achillea millefolium* L. e as alterações nos processos fisiológicos responsáveis por esse incremento. A pesquisa foi realizada, na casa de vegetação do setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com plantas da espécie *A. millefolium*. Os tratamentos conduzidos foram: controle (com água), solvente ácido acético (sem eliciador) e quitosana nas concentrações de 2, 4 e 6 g L<sup>-1</sup>. Foram avaliadas as medidas de crescimento, trocas gasosas, atividade enzimática do sistema antioxidante e da fenilalanina amônia-liase (PAL), além da produção e composição do óleo essencial. Observou-se que a aplicação de quitosana promoveu redução no crescimento das plantas; entretanto, a concentração de 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana induziu um aumento no teor e rendimento do óleo essencial. No óleo, foi verificada a predominância de compostos sesquiterpênicos, incluindo os majoritários: borneol,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -cubebeno,  $\alpha$ -farneseno e camazuleno. A elicitação com quitosana a 4 g L<sup>-1</sup> promoveu um aumento na taxa fotossintética, na atividade do sistema antioxidante e na PAL, porém esse aumento ocorreu, em curto prazo, apenas nos primeiros dias após a elicitação.

**Palavras-chave:** Óleo essencial. Mil-folhas. Novalgina. Quitosana. Plantas medicinais.

## ABSTRACT

Elicitation with chitosan is a tool used to improve the responses of plant defense by inducing secondary metabolism routes. In addition, the adequate application of this elicitor on medicinal plants can promote the increase of major components in the composition of the oil. However, we lack information concerning which are the main physiological processes responsible for the changes in the composition of the oil. Thus, we aimed at evaluating the action of chitosan and determine an ideal concentration for optimizing the production of essential oil in *Achillea millefolium* L. and the changes in the physiological processes responsible for this increase. The research was conducted in greenhouse of the Plant Physiology sector of the Universidade Federal de Lavras (UFLA) with *A. millefolium* plants. The treatments consisted of control (water); acetic acid solvent (with no elicitor); and chitosan in the concentrations of 2, 4 and 6 g L<sup>-1</sup>. The measurements of growth, gas exchange, enzyme activity of the antioxidant system and phenylalanine ammonia lyase (PAL), in addition to the production and composition of the essential oil. We verified that the application of chitosan promoted decrease in plant growth. However, the concentration of 4 g L<sup>-1</sup> of chitosan induced an increase in the content and yield of the essential oil. In the oil, there was predominance of sesquiterpenic compounds, including the major compounds borneol,  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -cubebene,  $\alpha$ -farnesene and chamazulene. The elicitation with chitosan at 4 g L<sup>-1</sup> promoted an increase of the photosynthetic rate, activity of the antioxidant system and of PAL, however, this increase occurred in short-term, only in the first days after elicitation.

**Keywords:** Essential oil. Thousand leaves. Novalgina. Chitosan. Medicinal plants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia de <i>Achillea millefolium</i> (A), detalhes da raiz com o rizoma (B) e folhas (C).....	15
Figura 2 - Estrutura química do camazuleno, um sesquiterpeno majoritário presente no óleo essencial de <i>Achillea millefolium</i> . ....	21
Figura 3 - Cascata de sinalização após a ligação do eliciador.. ....	24
Figura 4 - Estrutura química da quitosana. ....	25
Figura 5 - Variáveis de crescimento de <i>Achillea millefolium</i> após a imposição dos tratamentos: controle, solvente e quitosana nas concentrações 2, 4 e 6 g L <sup>-1</sup> .....	37
Figura 6 - Alocação de biomassa em <i>Achillea millefolium</i> após a imposição dos tratamentos: controle, solvente e quitosana nas concentrações 2, 4 e 6 g L <sup>-1</sup> .....	38
Figura 7 - Razão parte aérea/raiz em <i>Achillea millefolium</i> após a imposição dos tratamentos: controle, solvente e quitosana nas concentrações 2, 4 e 6 g L <sup>-1</sup> .....	39
Figura 8 - Análises de trocas gasosas realizadas em folhas de <i>A. millefolium</i> nos tratamentos controle (sem elicitar), solvente (ácido acético 0,25%) e quitosana 2, 4 e 6 g L <sup>-1</sup> .....	43
Figura 9 - Eletromicrografias de varredura das superfícies adaxial do limbo foliar de <i>Achillea millefolium</i> .....	48
Figura 10 - Eletromicrografias de varredura das superfícies abaxial do limbo foliar de <i>Achillea millefolium</i> .....	49
Figura 11 - Atividade específica da Dismutase do superóxido (SOD) em folhas de <i>A. millefolium</i> .....	54
Figura 12 - Atividade específica da Catalase (CAT) em folhas de <i>A. Millefolium</i> . ....	55

Figura 13 - Atividade específica da Peroxidase do ascorbato (APX) em folhas de <i>A. Millefolium</i> . .....	57
Figura 14 - Teor de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em folhas de <i>A.</i> <i>Millefolium</i> . .....	58
Figura 15 - Peroxidação lipídica em folhas de <i>A. millefolium</i> . .....	59
Figura 16 - Atividade da Fenilalanina amônia-liase (PAL) em folhas de <i>A.</i> <i>Millefolium</i> . .....	63
Figura 17 - Teor do óleo essencial (%) de <i>A. millefolium</i> L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana (2, 4 e 6 g L <sup>-1</sup> ), 90 dias após o transplante das mudas. ....	64

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Caracterização da superfície foliar de *A. millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana.....46
- Tabela 2 - Caracterização da superfície foliar de *A. millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana.....50
- Tabela 3 - Constituição química do óleo essencial de folhas de *Achillea millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana (área %  $\pm$  DP). Lavras, 2016. (Continua).....68
- Tabela 4 - Compostos majoritários (área %  $\pm$  DP) de *A. millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana. Plantas com 90 dias após o transplante das mudas. Lavras, 2016.....71

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1	Caracterização da espécie.....	13
2.2	Metabolismo secundário .....	16
2.3	Óleo essencial: composição química volátil.....	19
2.4	Elicidores: mecanismo de ação.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1	Obtenção das mudas .....	27
3.2	Elicitação .....	27
3.3	Caracterização do crescimento .....	28
3.4	Trocas gasosas.....	29
3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	29
3.6	Sistema antioxidante enzimático .....	30
3.6.1	Dismutase do Superóxido (SOD).....	31
3.6.2	Catalase (CAT) .....	31
3.6.3	Peroxidase do ascorbato (APX).....	31
3.6.4	Teor de peróxido.....	32
3.6.5	Peroxidação lipídica .....	32
3.7	Fenilalanina amônia-liase (PAL).....	33
3.8	Extração e análise química do óleo essencial .....	34
3.9	Delineamento experimental .....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1	Caracterização do crescimento .....	37
4.2	Trocas gasosas.....	41
4.3	Quantificação dos anexos da epiderme.....	46
4.4	Análise da atividade do sistema antioxidante enzimático e atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL).....	53
4.5	Produção e composição química do óleo essencial .....	64
5	CONCLUSÕES .....	73
	REFERÊNCIAS .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento popular sobre o uso e eficácia das plantas medicinais é uma tradição transmitida, ao longo das gerações e, muitas vezes, representa o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos. Populações de regiões pobres e, até mesmo de grandes cidades brasileiras, cultivam plantas medicinais para obtenção de renda, por sua comercialização em feiras e mercados populares (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002). Além disso, o aumento na demanda por produtos naturais, como consequência da busca por medicamentos análogos aos sintéticos, permitiu o destaque das plantas medicinais na agricultura (ALVARENGA, 2013).

Atualmente, o custo de produção de um medicamento sintético é elevado e tem apresentado redução na eficácia com o passar dos anos, em função da resistência dos patógenos às drogas químicas. Em contrapartida, o uso de plantas medicinais, na maioria dos casos, permite a fabricação de medicamentos em curto prazo e com menor custo, sendo, conseqüentemente, mais acessíveis à população (RODRIGUES, 2004).

Nos últimos anos, houve um aumento expressivo dos programas de fitoterapia, apoiados pelo serviço público de saúde, em função dos fatores sociais e econômicos contemporâneos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Por essas razões, os estudos com plantas medicinais intensificaram, visando compreender as vias de síntese das moléculas bioativas e os fatores que influenciam nos processos de síntese (BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009). A compreensão do funcionamento das vias biossintéticas permite a manipulação do metabolismo vegetal, com o objetivo de obter plantas com alto potencial, para a produção de metabólitos de interesse, utilizadas como matéria prima na indústria química.

Dentre as espécies medicinais cultivadas no Brasil, destaca-se a *Achillea millefolium* L., conhecida popularmente por mil-folhas. Esta espécie é

amplamente utilizada na medicina tradicional por ser facilmente obtida e propagada (AKRAM, 2013). A mil-folhas está entre as espécies medicinais com potencial para gerar produtos de interesse ao SUS (RENISUS), o que incentiva investimentos em pesquisa com a espécie (BRASIL, 2014).

A importância econômica de *A. millefolium* está associada, especialmente, à produção do óleo essencial, o qual pode ser empregado tanto para a fabricação de fármacos quanto para a indústria de cosméticos (PERES et al., 2009; ROSA et al., 2008). O óleo essencial da mil-folhas é composto, majoritariamente, por terpenos, os quais são responsáveis por suas propriedades medicinais, além de atuarem como parte do mecanismo de defesa da planta, contra o ataque de insetos herbívoros e patógenos (NADIM et al., 2011). Contudo, esses compostos são sintetizados em pequenas quantidades pela planta e uma das formas de incrementar sua produção é intensificando as vias de síntese.

O aumento da produção do óleo pode ser obtido por meio de estímulos, como, por exemplo, o uso de moléculas eliciadoras que promovem maior atividade das rotas do metabolismo secundário (GHANATI et al., 2014). Dentre os eliciadores utilizados, destaca-se a quitosana, por atuar de forma efetiva alterando a síntese de vários metabólitos secundários (LIM et al., 2013).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Caracterização da espécie

*Achillea millefolium* é um integrante da família Asteraceae, distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. É uma erva medicinal, conhecida, popularmente, por mil-folhas, milfolhada, milefólio, mil em rama, anador, atroveran e novalgina. Esta espécie é nativa da Europa, América do Norte, Austrália e Ásia, porém, atualmente, encontra-se amplamente distribuída pela flora brasileira (PERES et al., 2009; SALVAGNINI et al., 2006).

*A. millefolium* é uma pequena herbácea perene que apresenta até 50 cm de altura (Figura 1A). As folhas são compostas e pinadas, dispostas alternadamente, subdividindo em numerosos segmentos razão pela qual é conhecida por mil-folhas (Figura 1C). Durante a fase vegetativa, as folhas alternas se dispõem em roseta e, na fase de floração, algumas folhas menores se distribuem ao longo do eixo do escapo. As flores são pequenas de coloração branca ou rosada, unidas em capítulos dimorfos. Os frutos, também, pequenos são secos, com morfologia reprodutiva do tipo aquênio. Sua propagação ocorre, principalmente, pela via assexuada, por meio da divisão das touceiras, pelo rizoma (Figura 1B) ou por via sexuada através de sementes (AKRAM, 2013; GREGIO; MOSCHETA 2006; LIMA et al., 2006).

Com relação a características anatômicas, a folha é anfiestomática apresentando estômatos anomocíticos. A epiderme é revestida por uma cutícula delgada. Tricomas tectores e glandulares, em que o óleo essencial é sintetizado e armazenado, encontram-se distribuídos em ambas as faces da folha. Também estão presentes canais secretores acompanhando os feixes vasculares no rizoma, escapo e folha (GREGIO; MOSCHETA, 2006).

A mil-folhas é bastante utilizada na medicina tradicional em razão de sua ação cicatrizante, analgésica, diurética, anti-inflamatória, adstringente,

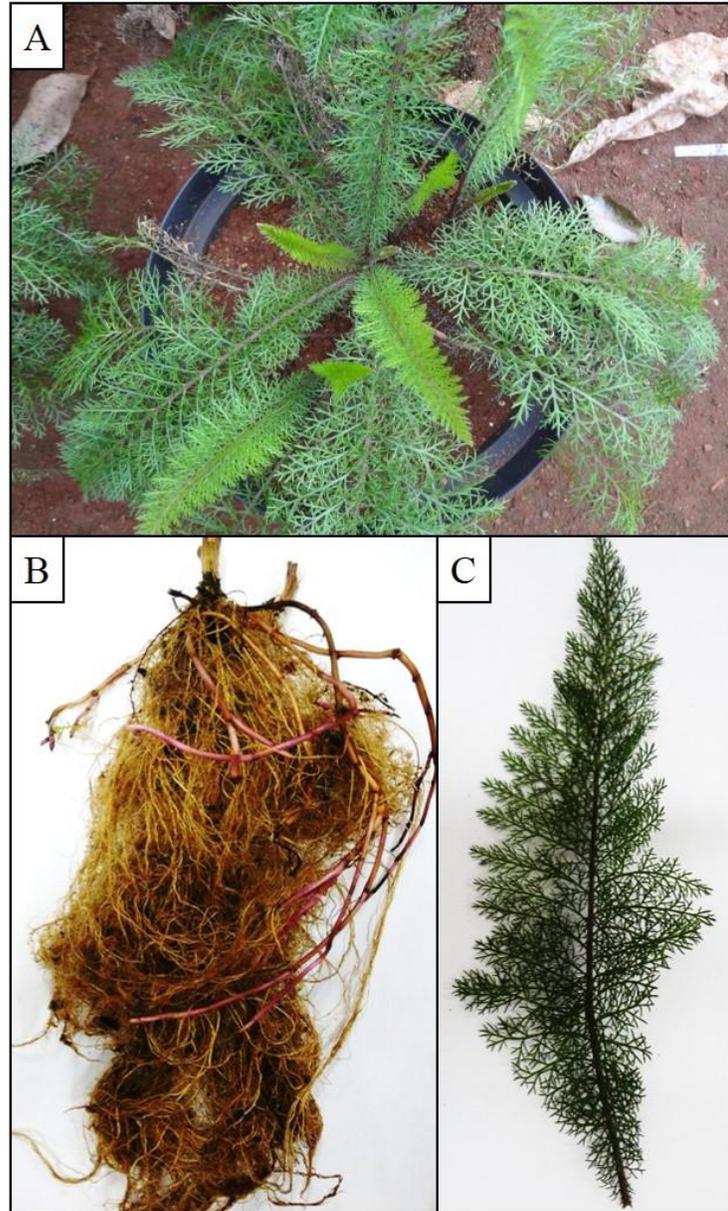
antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva, estrogênica e antialérgica. É empregada no combate de cólicas menstruais, inflamações respiratórias, diarreia, febre, gota e no cálculo renal. Também, pode ser aplicada, externamente, na forma de loções e pomadas, contra inflamações da pele, feridas, dores musculares, cortes e escoriações (AKRAM, 2013; FAZAL; AHMAD; KHAN, 2011; PINTO et al., 2014).

Atualmente, a mil-folhas é utilizada na indústria farmacológica para a produção de medicamentos naturais. Na área cosmética, o extrato de *A. millefolium* pode ser empregado na produção de cosméticos fotoprotetores (ROSA et al., 2008). Na indústria alimentícia, é utilizada como ingrediente para fabricação de licores e aromatizantes. No paisagismo, a mil-folhas é utilizada como planta ornamental (PINTO; SANTIAGO; LAMEIRA, 2000).

As partes da planta que são utilizadas para fins medicinais são o caule, folhas e as unidades florais. Quanto à composição química dessas partes, já foram encontrados vários grupos de moléculas bioativas, incluindo o ácido isoaléxico, ácido salicílico, asparagina, esteróis, flavonoides, taninos, cumarinas, além do óleo essencial. Por tal motivo, as espécies do gênero ganharam destaque nos programas de fitoterapia (GREGIO; MOSCHETA, 2006; NADIM et al., 2011).

O óleo essencial de *A. millefolium* tem uma grande importância econômica em virtude das suas propriedades anti-inflamatórias e desinfectantes, sendo usado, principalmente, contra resfriados e como um hemostático. A atividade biológica (bactericida, antifúngica, inseticida) do óleo está associada à presença de vários compostos terpênicos como o 1,8-cineol, cânfora, borneol e  $\beta$ -pineno (APPLEQUIST; MOERMAN, 2011; KINDLÓVITS; NÉMETH, 2012; NADIM et al., 2011). O teor do óleo essencial varia, de acordo com a fase de desenvolvimento e órgão vegetal, sendo as folhas e inflorescências, os órgãos com maior produção de óleo (GREGIO; MOSCHETA, 2006).

Figura 1 - Fotografia de *Achillea millefolium* (A), detalhes da raiz com o rizoma (B) e folhas (C).



Fonte: arquivo pessoal

## 2.2 Metabolismo secundário

Um dos fatores que propiciou a sobrevivência das plantas, no ecossistema terrestre, foi a capacidade de sintetizar metabólitos secundários, os quais atuam, diretamente, na redução dos efeitos de estresse ambiental e participam do sistema de defesa da planta (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011).

Os metabólitos secundários são todos os compostos orgânicos que não participam, diretamente, dos processos de fotossíntese, respiração, síntese de proteínas e translocação de minerais. Diferentemente dos metabólitos primários, os compostos secundários apresentam distribuição restrita no reino vegetal e certos metabólitos são restritos a determinadas espécies ou grupos taxonômicos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os compostos secundários são divididos em três grupos químicos, terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (FERNIE, 2007). Nas plantas, estes metabólitos apresentam uma variedade de funções ecológicas, atuando como substâncias atrativas para polinizadores e dispersores de sementes (KLIEBENSTEIN, 2004), na simbiose entre planta e microrganismos e na interação planta-planta (BAIS et al., 2006). Também atuam como compostos de defesa durante a herbivoria ou ataque de patógenos e na proteção contra estresses ambientais (BONALDO et al., 2004; SELMAR; KLEINWACHTER, 2013).

Embora não apresentem função direta nos processos fisiológicos básicos como crescimento e desenvolvimento, os metabólitos secundários são cruciais para manter a homeostase fisiológica das plantas sob condições adversas. Sua biossíntese pode variar, de acordo com o estágio de desenvolvimento, órgão vegetal e fatores ambientais como temperatura, umidade, disponibilidade hídrica, dentre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Dentre os compostos secundários produzidos pelo vegetal, os fenóis ou fenilpropanoides apresentam uma grande diversidade química e funcional. Basicamente são formados por um grupo hidroxila ligado a um anel aromático e podem ser encontrados na forma conjugada ligados a açúcares, álcoois ou terpenos. Essas formas conjugadas são fenóis complexos (polifenóis) e desempenham importantes funções nas plantas (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; QUIDEAU et al., 2011). Como exemplo, a lignina, uma macromolécula fenólica e altamente complexa, cuja principal função é proporcionar suporte mecânico e proteção contra os ataques de herbívoros e patógenos, sendo uma importante barreira de defesa para a planta (BARBER; MITCHELL, 1997; CARL, 1996).

Os compostos fenólicos são sintetizados por duas rotas metabólicas, a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico. Em plantas, a rota do ácido chiquímico é mais expressiva, sendo responsável pela produção da maioria dos fenóis. Nessa rota de síntese, esqueletos de carbono, provenientes da glicólise e da rota das pentoses fosfato, são convertidos em três aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), os quais são utilizados como precursores para a síntese dos principais compostos fenólicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; WEISSHAAR; JENKINS, 1998). A maioria dos fenóis é derivada da fenilalanina, por intermédio da reação catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), a qual é responsável por retirar a amônia da fenilalanina, formando o ácido cinâmico, precursor dos demais compostos fenólicos (NOEL; AUSTIN; BOMATI, 2005).

A PAL é uma das enzimas mais estudadas no metabolismo secundário, sobretudo por atuar como um regulador chave na transição do metabolismo primário para o secundário. O ponto de controle da enzima pode ser tanto em nível de atividade quanto de transcrição. Fatores ambientais, como luz e disponibilidade de nutrientes, podem aumentar a atividade da enzima, em nível

de modulações pós-traducionais. Outros fatores, como infecções por fungos, ativam uma cascata de sinalização que induz a transcrição e tradução do RNA mensageiro que codifica a PAL. Desta forma, o aumento dos níveis da enzima, no interior celular, resulta em um aumento na síntese de compostos fenólicos, especialmente, aqueles relacionados à defesa da planta (BOUDET, 2007; FERRER et al., 2008).

Outra grande classe de compostos secundários é a formada por terpenos. Todos os terpenos compartilham uma estrutura química similar e são formados pela união de unidades de cinco carbonos (C5) ou unidades isoprênicas. Em função do número de unidades isoprênicas, que constituem sua estrutura, os compostos terpênicos são classificados em monoterpenos (duas unidades C5), sesquiterpenos (três unidades C5), diterpenos (quatro unidades C5) e, assim por diante, sendo as estruturas mais complexas denominadas politerpenoides (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007; PETERSEN, 2007).

Os terpenos são sintetizados por duas rotas metabólicas que utilizam esqueletos de carbono provenientes do metabolismo primário. Na rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil-CoA, presentes no citoplasma, são unidas para formar o conhecido ácido mevalônico. Esse intermediário segue por uma série de reações (pirofosforilação, descarboxilação, desidratação), para, então, produzir o isopentenil difosfato (IPP), o qual será a unidade inicial para a síntese dos demais terpenos. A segunda rota, também conhecida como rota do metileritritol fosfato (MEP), ocorre em cloroplastos e demais plastídeos. Nesta via, o piruvato, derivado da glicólise e o gliceraldeído-3-fosfato proveniente do ciclo de Calvin, unem-se para formar um intermediário que é, rapidamente, convertido em IPP. A partir do IPP, os demais compostos terpênicos serão sintetizados (BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009; PETERSEN, 2007).

As plantas medicinais produzem uma grande diversidade de compostos secundários que são biologicamente ativos, especialmente monoterpenos e sesquiterpenos, além de certos compostos aromáticos que conferem um aroma característico às flores e folhas. O próprio óleo essencial é considerado uma mistura complexa, constituído, em sua maioria, por monoterpenos e sesquiterpenos voláteis e uma pequena quantidade de fenilpropanoides e álcoois (BAKKALI et al., 2008; BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

A compreensão do funcionamento das vias de síntese dos metabólitos secundários é fundamental para auxiliar na elucidação dos fatores que causam alterações na produção e composição desses metabólitos. Principalmente aqueles que fazem parte da constituição química do óleo essencial.

### 2.3 Óleo essencial: composição química volátil

O óleo essencial da *Achillea millefolium* é constituído, majoritariamente, por monoterpenos e sesquiterpenos voláteis. Os principais compostos monoterpênicos, encontrados no óleo, são: 1,8 cineol, cânfora, borneol,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno e  $\alpha$ -terpineol. Os sesquiterpenos majoritários são:  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -cubebeno,  $\alpha$ -farneseno e camazuleno (KINDLOVITS; NÉMETH, 2012; NADIM et al., 2011; SALVAGNINI et al., 2006).

O borneol é um monoterpeno que, também, está presente no óleo essencial de *Salvia officinalis*, *Matricaria chamomilla* (camomila), *Piper malacophyllum* e *Hyptis suaveolens*. Possui atividade antifúngica, antibacteriana, tranquilizante, antiespasmódica e anti-inflamatória (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; MARTINS; SANTOS; POLO, 2006; SANTOS et al., 2012; TABANCA et al., 2001).

O  $\beta$ -cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico encontrado em outras espécies medicinais como *Chamomilla recutita* (camomila alemã), *Lippia sidoides*, *Hyptis martiusii*, *Syzigium aromaticum* e *Plectranthus amboinicus*. É

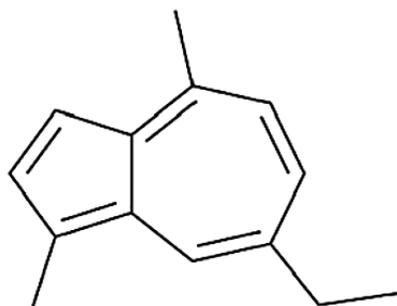
responsável pelas propriedades anti-inflamatória, antiedêmica, antitumoral, bactericida, inseticida e espasmolítica (BORSATO et al., 2007; CARNEIRO et al., 2010; COSTA et al., 2005).

O  $\beta$ -cubebeno é um sesquiterpeno responsável pelas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e inseticida do óleo essencial. É encontrado em *Schinus terebinthifolius*, cujo óleo essencial pode ser utilizado como inseticida natural no combate da broca-do-café. Também está presente no óleo essencial de *Piper aduncum*, *Lippia alba* e espécies do gênero *Bacharis* (BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009; FLORAO et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

O  $\alpha$ -farneseno é um sesquiterpeno responsável pelo aroma característico do óleo essencial de *Citrus sudachi*. Em *Matricaria chamomilla*, a porcentagem deste composto no óleo corresponde a 8,7%. Estudos indicam que o  $\alpha$ -farneseno e seu isômero  $\beta$ -farneseno possuem potencial para atuar como um antimutagênico. O farneseno, também, é considerado um dos constituintes responsáveis pela atividade anti-quimiostática observada no óleo essencial de camomila (AYOUGHI et al., 2011; HERNÁNDEZ-CERUELOS; MADRIGAL-BUJAIAR; DE LA CRUZ, 2002; MOOKDASANIT et al., 2003; PRESIBELLA et al., 2006).

O camazuleno (Figura 2) é um sesquiterpeno responsável pela coloração azulada do óleo essencial. Esse composto é derivado da matricina, uma lactona terpênica que, sob condições de temperatura e pressão específicas, obtidas pelo processo de hidrodestilação, é convertida em camazuleno. Possui propriedades bactericida, fungicida, anti-inflamatória e antioxidante. Além da *Achillea millefolium*, ele está presente no óleo essencial de *Matricaria recutita*, *Matricaria chamomilla* e *Tanacetum gracile* (NOGUEIRA; MINETTO, 2005; SINGH et al., 2011; VERMA et al., 2008).

Figura 2 - Estrutura química do camazuleno, um sesquiterpeno majoritário presente no óleo essencial de *Achillea millefolium*.



Camazuleno

Fonte: Óleos... (2009)

Os compostos majoritários, presentes no óleo de *Achillea millefolium* e, também, encontrados nos óleos essenciais de outras espécies medicinais, são considerados moléculas bioativas de interesse, com propriedades medicinais comprovadas. Por essa razão, é importante avaliar a influência dos fatores que alteram a quantidade e constituição química desses componentes do óleo essencial.

#### 2.4 Elicidores: mecanismo de ação

Os eliciadores bióticos são moléculas derivadas de microorganismos, como elementos estruturais da parede celular de fungos ou fragmentos do flagelo de bactérias. Essas moléculas são, também, conhecidas por MAMPs: padrões moleculares associados a patógenos. As plantas apresentam uma variedade de receptores de membrana que reconhecem os MAMPs do patógeno no momento da infecção (HANN et al., 2014; TERRY; JOYCE, 2004).

Um dos eventos iniciais que ocorre, durante a interação planta-patógeno, é a percepção do eliciador pelo receptor específico de membrana. A ligação do

eliciador (MAMPs) ao receptor vegetal (ex: BAK1) ativa uma complexa cascata de sinalização envolvendo componentes como  $\text{Ca}^{2+}$ , óxido nítrico e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Essa cascata de sinalização resulta na produção de proteínas de defesa e metabólitos secundários específicos, conduzindo à resistência da planta (AGURLA; GAYATRI; RAGHAVENDRA, 2014; HANN et al., 2014).

A ligação do eliciador ao receptor ativa a enzima NADPH-oxidase, que está localizada na membrana da célula vegetal e catalisa a reação de redução do  $\text{O}_2$  molecular. O ponto inicial da rota de transdução de sinal é a explosão oxidativa, que implica um pool de compostos tóxicos formados pela redução do oxigênio molecular. Tais compostos são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) e incluem o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) (LEHMANN et al., 2015).

A explosão oxidativa aciona, em um primeiro momento, a resposta de hipersensibilidade, que resulta na morte da célula vegetal como mecanismo de defesa para patógenos biotróficos. A segunda linha de resposta envolve a abertura dos canais de cálcio e o influxo transitório de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esse mensageiro secundário, juntamente com as EROs, são fatores necessários para a ativação da enzima óxido nítrico sintase, resultando no acúmulo de óxido nítrico no interior celular. O  $\text{Ca}^{2+}$ , óxido nítrico e  $\text{H}_2\text{O}_2$  são componentes da rota de sinalização que ativam a cascata de MAP kinases, alterando a expressão de genes relacionados à síntese de enzimas hidrolíticas, fitoalexinas, lignina e compostos secundários importantes no mecanismo de defesa da planta como flavonoides, taninos e determinados tipos de terpenos (AGURLA; GAYATRI; RAGHAVENDRA, 2014; LEHMANN et al., 2015).

Simultaneamente aos eventos induzidos pela infecção patogênica, peptídeos (PEPs) que atuam como eliciadores endógenos são produzidos e secretados pela célula vegetal para amplificar as respostas de defesa iniciadas por MAMPs. Após o processamento e liberação os peptídeos, são reconhecidos

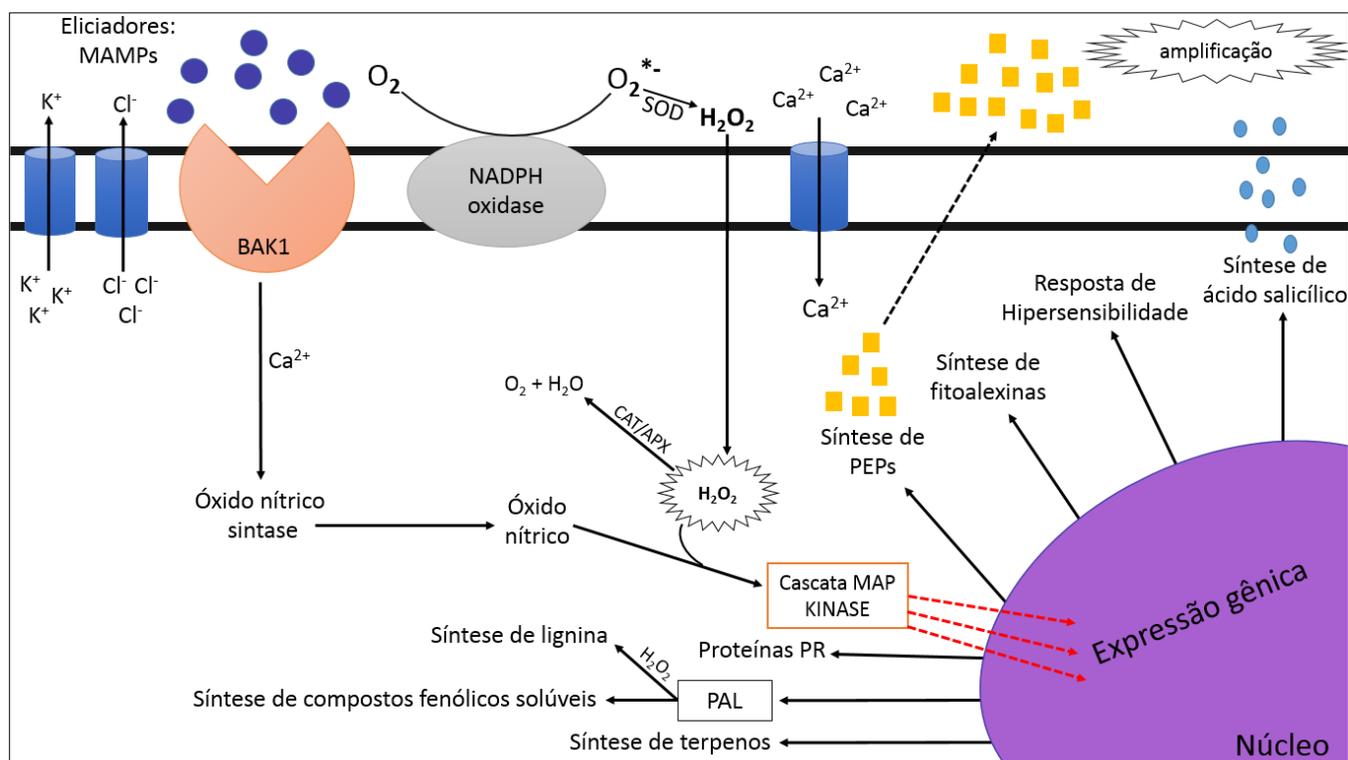
nas células adjacentes por receptores PEP complexados com BAK1, iniciando uma nova cascata de sinalização. Juntamente aos PEPs, outros componentes de sinalização como fitormônios (ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno) estão envolvidos na amplificação e aperfeiçoamento da rota de transdução de sinal, intensificando as respostas de defesa, como pode ser visualizado na Figura 3 (YAMAGUCHI; HUFFAKER, 2011).

A busca pela compreensão das vias de sinalização levou à descoberta de compostos sintéticos que induzem respostas de defesa semelhantes às aquelas causadas durante a infecção patogênica. Os eliciadores abióticos são compostos químicos sintéticos e atuam como sinalizadores em baixas concentrações. Esses compostos simulam o mecanismo de percepção e sinalização que ocorre, durante a invasão do patógeno, resultando na expressão diferencial de genes relacionados à defesa sistêmica adquirida (THAKUR; SOHAL, 2013).

O uso de moléculas eliciadoras como o ácido salicílico, metil jasmonato e quitosana tem-se mostrado eficaz na indução da síntese de metabólitos secundários de interesse, justamente por ativar os mecanismos de reconhecimento e, conseqüentemente, alterar a expressão gênica (DONG; WAN; LIANG, 2010; WANG et al., 2015; YIN et al., 2012).

Apesar da eficácia dos eliciadores, a resposta gerada varia de acordo com a espécie em estudo e depende de vários fatores, como o tipo de eliciador utilizado, as concentrações aplicadas, o estágio de desenvolvimento da planta, o tempo de exposição ao eliciador e a forma de aplicação. Dentre os eliciadores estudados, a quitosana tem mostrado resultados promissores na indução da síntese de compostos secundários, em espécies medicinais, como observado em *Artemisia annua* (GHANATI; BAKHTIARIAN, 2013), *Orthosiphon stamineus* (LIM et al., 2013) e *Hypericum perforatum* (BRASIL et al., 2014), indicando que este eliciador pode promover respostas satisfatórias para a espécie em estudo.

Figura 3 - Cascata de sinalização após a ligação do eliciador.

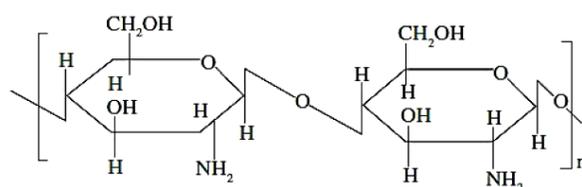


Legenda: MAMPs: padrões moleculares associados a patógeno; BAK1: receptor de membrana; SOD: Superóxido dismutase; CAT: Catalase; APX: Ascorbato peroxidase; PAL: Fenilalanina amônia liase; PR: proteínas relacionadas à patogênese; PEPs: eliciadores endógenos.

Fonte: Adaptado de Thakur e Sohal (2013) e Yamaguchi e Huffaker (2011).

A quitosana é um composto orgânico, obtida, industrialmente, por meio da desacetilação alcalina da quitina (Figura 4). Por ser um polissacarídeo derivado da quitina, a quitosana pode ser extraída do exoesqueleto de insetos, crustáceos e da parede celular de fungos. Sua forma comercial apresenta 80-90% de desacetilação e contém 100% de glucosamina e 30% de N-acetilglucosamina (DIAS et al., 2013).

Figura 4 - Estrutura química da quitosana.



Fonte: (SPIN-NETO et al., 2008).

Após sua aplicação na superfície foliar, a quitosana deve ser absorvida para desencadear as respostas fisiológicas na planta. É improvável que sua absorção ocorra pela cutícula, tendo em vista seu alto peso molecular e complexidade estrutural. Estudos recentes confirmaram que a quitosana, aplicada na folha, é capaz de se mover para o interior dos tecidos por meio dos estômatos (IRITI et al., 2010). Depois de ser absorvida, enzimas apoplásticas atuam despolimerizando o polissacarídeo em fragmentos menores denominados oligossacarídeos. Esse processo é essencial, para dar início ao mecanismo de percepção, pois pequenos oligossacarídeos são mais fáceis de difundir pelos tecidos, portanto, caracterizando-se como eliciadores mais potentes (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006; KAKU et al., 2006).

Apesar da eficácia dos eliciadores, a resposta gerada depende da espécie em estudo. A mil-folhas é uma importante planta medicinal, porém sua taxa de produção de óleo essencial é muito baixa e a quitosana, sendo considerada um potente eliciador, pode atuar aumentando o teor do óleo essencial e alterando a composição química dos constituintes voláteis. Diante do exposto, objetivou-se, nesta pesquisa, avaliar a ação da quitosana, na produção dos metabólitos secundários e, em alguns processos fisiológicos de *Achillea millefolium*, com o intuito de determinar uma concentração ideal para otimizar a produção do óleo essencial em termos de qualidade e rendimento.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das mudas

As mudas de *A. millefolium* foram produzidas por micropropagação no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais - UFLA. Para a multiplicação das mudas, foram utilizados segmentos nodais (2 cm), obtidos de plantas matrizes e transferidos para tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Os explantes permaneceram, em sala de crescimento, por 60 dias, sob irradiância de  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2,5^\circ\text{C}$ .

Após o crescimento *in vitro*, as mudas foram transferidas para bandejas de polipropileno, contendo 72 células preenchidas com substrato comercial Hortplant<sup>®</sup>, onde permaneceram por 60 dias em casa de vegetação.

Após a aclimatização, as mudas foram transplantadas para vasos, com capacidade de 5L. O substrato utilizado foi composto por subsolo e areia, na proporção de 2:1 e enriquecido com a formulação de NPK 4-14-8, na proporção de 2 kg por  $\text{m}^3$  de substrato. O solo utilizado apresentava as seguintes características físico-químicas: pH (água): 5,4; P: 4,13  $\text{mg.dm}^3$ ; K: 73,32  $\text{mg.dm}^3$ ; Ca: 2,30  $\text{cmolc.dm}^{-3}$ , Mg: 0,30  $\text{cmolc.dm}^{-3}$ , Al: 0,10  $\text{cmolc.dm}^{-3}$ , H+Al: 2,90  $\text{cmolc.dm}^{-3}$ , V: 49,00%; matéria orgânica: 2,10  $\text{dag.kg}^{-1}$ , Argila: 70,00  $\text{dag.kg}^{-1}$ ; Silte: 16,00  $\text{dag.kg}^{-1}$  e Areia: 14,00  $\text{dag.kg}^{-1}$ , sendo analisado pelo Laboratório de Análises de Solos do Departamento de Ciências do Solo - UFLA.

#### 3.2 Elicitação

As plantas permaneceram nos vasos, durante 90 dias, para a posterior condução dos tratamentos. Foram realizados cinco tratamentos correspondendo às concentrações de 0; 2; 4 e 6  $\text{g L}^{-1}$  de quitosana e um tratamento com o solvente (ácido acético 0,25%). Cada tratamento foi composto por 20 repetições

e cada planta foi considerada uma repetição. Para evitar o possível evento de sinalização entre as plantas, cada tratamento foi disposto a uma distância de, aproximadamente, dois metros.

O experimento foi conduzido, no mês de maio de 2015, na casa de vegetação do Setor de Fisiologia Vegetal - UFLA. A temperatura máxima, durante a condução do experimento, foi 24,15°C, mínima de 14,04°C e umidade média relativa de 74,83%. O preparo da quitosana foi realizado conforme metodologia descrita por Korsangruang et al. (2010), modificada. As soluções correspondentes aos tratamentos foram preparadas, dissolvendo o eliciador em ácido acético (0,25%), sob agitação constante e correção do pH para 6,0 com hidróxido de sódio. A solução foi aplicada nas folhas, por meio de pulverizadores manuais, na base de 30 mL por planta, volume suficiente para cobrir toda a parte aérea. Nas plantas controle, foi pulverizada água destilada em igual volume e o mesmo volume no controle do solvente com ácido acético a 0,25%.

### **3.3 Caracterização do crescimento**

A caracterização do crescimento foi realizada em 10 plantas por tratamento, em que foram avaliadas as seguintes variáveis: área foliar total, número de folhas, número de perfilhos, massa seca da parte aérea, massa seca do rizoma, massa seca da raiz, massa seca total e razão parte aérea raiz ( $PA/R = MSPA/MSRA$ ).

O número de folhas foi obtido pela contagem direta de cada folha, o mesmo foi realizado para o número de perfilhos. A área foliar foi mensurada por meio de um medidor de área foliar (LICOR). Os valores de massa seca da parte aérea, rizoma e raiz foram obtidos a partir da secagem do material em estufa de circulação forçada a  $\pm 65$  °C até atingir massa constante, seguido da pesagem em

balança de precisão. Todas as medidas de crescimento foram realizadas ao final do experimento, 15 dias após a aplicação do eliciador.

### 3.4 Trocas gasosas

Para avaliação das trocas gasosas, foram selecionadas quatro plantas por tratamento e de cada planta foi analisada uma folha totalmente expandida. As medições foram realizadas em dias sem nebulosidade, no período de 9 às 10 horas da manhã. As análises foram conduzidas, utilizando um analisador portátil de CO<sub>2</sub> infravermelho (IRGA), marca LI-COR®, modelo LI-6400. A densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativo foi padronizada para 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

As variáveis analisadas foram: fotossíntese líquida (A), condutância estomática (gs), transpiração (E), concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (Ci), relação Ci/Ca e eficiência instantânea do uso da água (EUA). As análises foram realizadas, em três dias, durante a condução do experimento: 2º, 7º e 15º após a aplicação do eliciador.

### 3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A caracterização da superfície foliar foi realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura. Para a coleta do material, foram selecionadas três plantas por tratamento. Antes da aplicação do eliciador, os primórdios foliares foram marcados e, no 20º dia após a elicitação, foram coletadas duas folhas recém - formadas de cada planta.

Após a coleta, os fragmentos foliares foram fixados em *Karnovsky* [Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2) + CaCl<sub>2</sub> 0,001 M]. Depois da primeira fixação, os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas e desidratados em gradiente crescente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100% 3X). Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem ao ponto crítico

(BAL-TEC, modelo CPD-030, Principality of Liechtenstein) e montadas em stubs. Na sequência, as amostras foram metalizadas no evaporador de ouro Sputtering (BAL-TEC, modelo SCD-050, Principality of Liechtenstein) e conduzidas para análise no Microscópio Eletrônico de Varredura (LEO EVO 40 XVP).

Com base nas imagens obtidas, foram mensuradas a densidade de estômatos (DE), tricomas tectores (DTT) e glandulares (DTG). A densidade de estômatos (número de estômatos por  $\text{mm}^2$ ) e tricomas (número de tricomas por  $\text{mm}^2$ ) foi obtida, na face adaxial e abaxial da folha, com auxílio do software ImageJ.

### **3.6 Sistema antioxidante enzimático**

Para análise do sistema antioxidante enzimático, foram avaliadas as atividades das enzimas Dismutase do Superóxido (SOD), Catalase (CAT) e Peroxidase do ascorbato (APX). Além da quantificação do teor de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e peroxidação lipídica.

A coleta do material foi realizada, entre 10 e 11 horas da manhã, nos seguintes intervalos: 1º, 2º, 3º e 7º dia após a elicitação. Foram selecionadas três plantas por tratamento e de cada planta foram coletadas duas folhas totalmente expandidas. As amostras foram armazenadas no freezer a  $-86^\circ\text{C}$ , até o preparo do extrato vegetal. Para a obtenção do extrato, 200 mg do material vegetal foram macerados com nitrogênio líquido e antioxidante PVPP. O meio de extração foi composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 8,0), EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 10 mM e água destilada. Em cada microtubo (*ependorf*), foram acrescentados 1500  $\mu\text{L}$  do meio de extração. O extrato foi centrifugado a 13000g, por 10 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ , sendo o sobrenadante utilizado para a quantificação das enzimas SOD, CAT e APX.

### **3.6.1 Dismutase do Superóxido (SOD)**

A atividade da SOD foi avaliada, conforme metodologia descrita por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações, em que 10 µL do sobrenadante foi pipetado em placa de acrílico UV juntamente com o meio de incubação. O meio de incubação foi composto por: solução tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM, riboflavina 2 µM e água destilada. Em seguida, a placa foi iluminada com lâmpada fluorescente de 20 W durante 7 minutos. A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de ELISA a 560 nm.

### **3.6.2 Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi avaliada, de acordo com a metodologia descrita por Havir e McHale (1987), em que 9 µL do sobrenadante foram pipetados, em placa de acrílico, juntamente com o meio de incubação. O meio de incubação foi composto por solução tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), peróxido de hidrogênio 12,5 mM e água destilada. A atividade da enzima foi determinada pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a cada 15 segundos, durante 3 minutos, conforme a leitura da absorbância em espectrofotômetro de ELISA a 240 nm.

### **3.6.3 Peroxidase do ascorbato (APX)**

A atividade da APX foi determinada, de acordo com a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981), com modificações, na qual 8 µL do sobrenadante foram pipetados em placa de acrílico juntamente com o meio de incubação. O meio de incubação foi composto por uma solução tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM, peróxido de hidrogênio 0,1 mM e água destilada. A atividade da APX foi determinada pela taxa de oxidação do ascorbato, a cada 15 segundos, durante 3 minutos, por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro de ELISA a 290 nm.

### 3.6.4 Teor de peróxido

O teor de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi quantificado, de acordo com a metodologia proposta por Alexieva et al. (2001). Inicialmente, 200 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido e PVPP. Em cada microtubo (*ependorf*), contendo o extrato macerado, foram adicionados 1500  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e submetido à centrifugação a 12000 g por 15 minutos, a 4° C.

Em seguida, o sobrenadante foi coletado e 45  $\mu$ L do extrato foram transferidos para microtubo, contendo o meio de reação, composto por uma solução tampão fosfato de potássio 100 mM (pH7,0) e iodeto de potássio 1 M. As leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro de ELISA a 390 nm. O teor de  $H_2O_2$  foi obtido, por meio de cálculos, baseados na curva padrão de peróxido.

### 3.6.5 Peroxidação lipídica

A quantificação da peroxidação lipídica foi obtida pelo método de TBARS (ácido tiobarbitúrico). O material vegetal (200 mg) foi macerado com nitrogênio líquido e PVPP. Em cada microtubo, contendo o extrato macerado, foram adicionados 1500  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e submetido à centrifugação a 12000 g por 15 minutos, a 4° C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e 125  $\mu$ L do extrato foram transferidos para microtubo contendo 500  $\mu$ L do meio de reação. O meio de reação foi composto por uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% e ácido tricloroacético (TCA) 10%. O extrato juntamente com o meio de reação foi mantido em banho - maria a 95°C, por 30 minutos e, posteriormente, submetido ao resfriamento rápido em gelo para paralisar a reação. Após a paralisação, 200  $\mu$ L do extrato foram pipetados em placa de acrílico. As leituras da absorbância foram realizadas, em espectrofotômetro de ELISA, a 535 e a 600

nm. A peroxidação lipídica foi obtida, por meio de cálculos e expressa em nmol de MDA.g<sup>-1</sup> de matéria fresca (MF).

### **3.7 Fenilalanina amônia-liase (PAL)**

Além do sistema antioxidante enzimático, foi avaliada a atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase (PAL). A coleta do material foi realizada entre 10 e 11 horas da manhã, nos seguintes intervalos: 1º, 2º, 3º e 7º dia após a elicitação. Foram selecionadas três plantas por tratamento e de cada planta foram coletadas duas folhas totalmente expandidas. Em seguida, as amostras foram armazenadas no freezer a -86°C, até o preparo do extrato vegetal.

A atividade da enzima foi avaliada, de acordo com a metodologia descrita por Mori, Sakurai e Sakuta (2001), com modificações. Para a obtenção do extrato, 300 mg do material vegetal foram macerados com nitrogênio líquido e PVPP.

O meio de extração foi composto por tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0) e betamercapto 10mM. Em cada microtubo, contendo o extrato macerado, foram adicionados 1500 µL do meio de extração e submetido à centrifugação a 10000 g, por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e 5 µL do extrato vegetal pipetado em placa de acrílico contendo o meio de incubação. O meio de incubação foi composto por tampão Tris-HCL 100 mM (pH 8,8) e fenilalanina 50 mM. A incubação foi realizada em banho - maria a 38°C por 3 horas.

Após a incubação, a reação foi paralisada com HCL 5N e as leituras realizadas, em espectrofotômetro de ELISA, a 280 nm, em intervalos de tempo de 15 segundos, durante 3 minutos. A atividade da PAL foi expressa em µM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína utilizando o coeficiente de extinção molar de 10<sup>4</sup> mM<sup>-1</sup> cm<sup>1</sup>.

### 3.8 Extração e análise química do óleo essencial

A quantificação e análise química dos constituintes do óleo essencial foram realizadas, no final do experimento, 15 dias após a aplicação do eliciador. Foram selecionadas 10 plantas intactas em cada tratamento. Dessas plantas, folhas e caules foram coletados e desidratados em estufa de circulação forçada, a 40 °C até peso constante.

A extração do óleo essencial foi realizada pelo processo de hidrodestilação, em que 10 g do material vegetal seco juntamente com 1 litro de água destilada foram colocados em balão volumétrico acoplado a um aparato de Clevenger, durante 90 minutos.

O óleo obtido pela hidrodestilação foi purificado por partição líquido-líquido com diclorometano e tratado com sulfato de magnésio anidro para eliminação da água nas amostras. Após este procedimento, a solução foi filtrada e o solvente diclorometano evaporado na capela de exaustão de gases. O teor do óleo foi obtido, com base na equação 1 e o rendimento do óleo essencial obtido com a elicitação foi calculado pela Equação 2.

$$TO (\%) = (PO/PA) \times 100$$

**Equação 1.** Teor do óleo essencial obtido por meio da hidrodestilação de folhas de *Achillea millefolium*. Onde, TO corresponde ao teor de óleo essencial, PO é o peso do óleo obtido após a hidrodestilação e PA refere-se ao peso da amostra.

$$\frac{((TO \text{ trat } x) - (TO \text{ cont})) - \frac{(MS \text{ cont} - MS \text{ trat } x) \cdot (TO \text{ cont})}{MS \text{ cont}}}{MS \text{ cont}}$$

**Equação 2.** Rendimento do óleo essencial em folhas de *Achillea millefolium*. TO cont, corresponde ao teor do óleo em plantas controle, TO trat x ao teor do óleo em plantas do tratamento x, sendo “x” representado pelos tratamentos com quitosana. MS cont, representa a massa seca das plantas controle e MS trat x representa a massa seca do tratamento x.

As análises químicas do óleo essencial foram realizadas pela combinação de técnicas de Cromatografia de Fase Gasosa (CG) e de Cromatografia de Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM).

Nas análises dos constituintes voláteis do óleo por Cromatografia de Fase Gasosa, foi utilizado um Cromatógrafo Agilent® 7890A, operado com sistema de processamento de dados HP GC ChemStation Ver. A.01.14, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) e um detector de ionização de chama (DIC).

As amostras foram preparadas, por meio da diluição do óleo essencial, em acetato de etila (1%, v/v). O volume de injeção da amostra foi de 1 µL, no modo *Split* a uma razão de injeção de 1:50. Foi utilizada a coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Gás Hélio foi utilizado, para arraste com fluxo de 1,0 mL/min, as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. A temperatura inicial do forno foi de 60°C, seguida por uma rampa de temperatura de 3°C/min até 200°C, seguida por uma rampa de 10°C/min até 270°C, mantendo-se em condição isotérmica por 1 minuto. As concentrações dos constituintes voláteis foram expressas pela porcentagem média da área relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão de três amostras analisadas por tratamento.

As análises por CG/EM foram realizadas no Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scans/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC.

Os constituintes voláteis foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C9-C25, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massa do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST SPEECH GROUP WEBSITE, 2008) e da literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados por meio da equação de Vandendool e Kratz (1963) e, para contribuições, foram consultados os índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007; KOTAN et al., 2010).

### **3.9 Delineamento experimental**

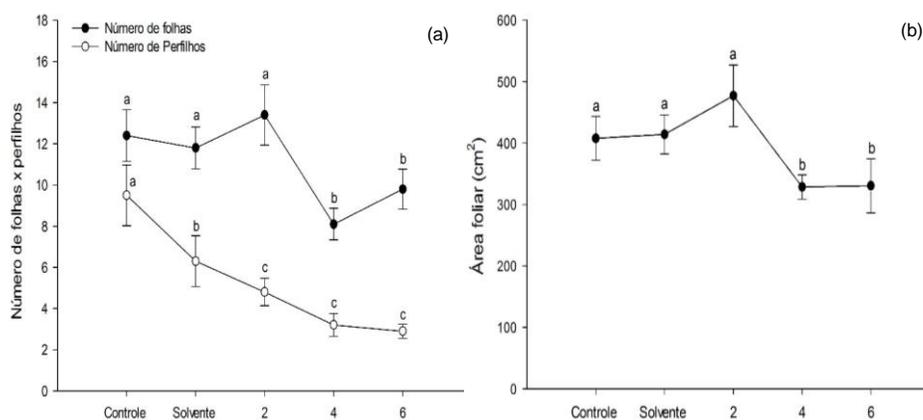
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando 10 repetições (uma planta por repetição), para as medidas de crescimento, 4 para as medições de trocas gasosas e 3 repetições para as demais análises. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SISVAR versão 4.3 (FERREIRA, 1999).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização do crescimento

As variáveis relacionadas ao crescimento apresentaram diferenças significativas após o tratamento com quitosana. Observou-se que a aplicação de quitosana, acima da concentração de  $2 \text{ g L}^{-1}$ , reduziu o número de folhas (Figura 5A) e a área foliar (Figura 5B). No entanto, para o número de perfilhos, as plantas tratadas apenas com o solvente e quitosana, nas três concentrações, apresentaram valores reduzidos em relação ao controle (Figura 5A).

Figura 5 - Variáveis de crescimento de *Achillea millefolium* após a imposição dos tratamentos: controle, solvente e quitosana nas concentrações 2, 4 e  $6 \text{ g L}^{-1}$ .

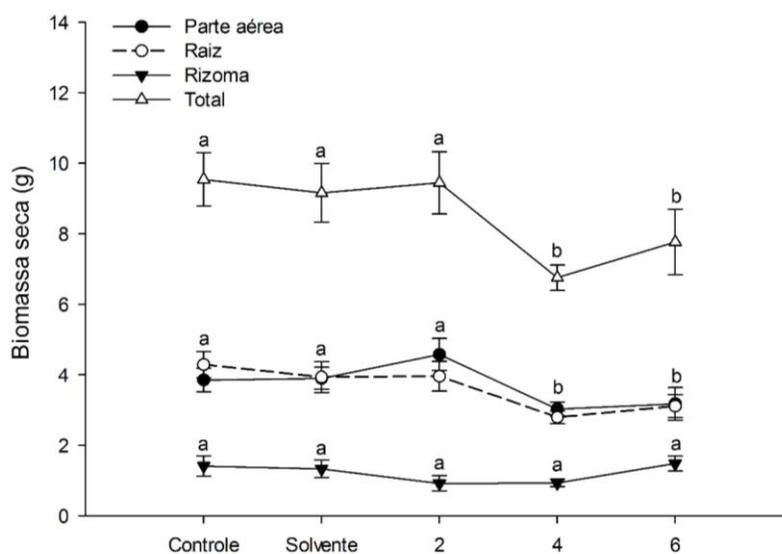


Legenda: A- número de folhas e perfilhos; B- área foliar. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Foi verificada uma redução significativa no acúmulo de biomassa seca na parte aérea e raiz, nos tratamentos com as maiores concentrações de quitosana (4 e  $6 \text{ g L}^{-1}$ ). Resultado similar foi encontrado, na massa seca total da planta, com exceção do rizoma, em que os tratamentos não diferiram entre si (Figura 6).

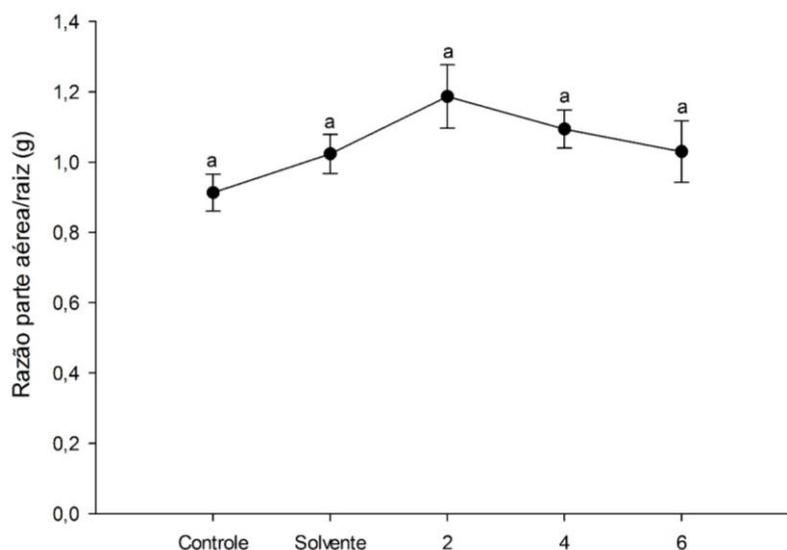
Os resultados da razão PA/R não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com o eliciador e as plantas do controle (Figura 7).

Figura 6 - Alocação de biomassa em *Achillea millefolium* após a imposição dos tratamentos: controle, solvente e quitosana nas concentrações 2, 4 e 6 g L<sup>-1</sup>.



Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 7 - Razão parte aérea/raiz em *Achillea millefolium* após a imposição dos tratamentos: controle, solvente e quitosana nas concentrações 2, 4 e 6 g L<sup>-1</sup>.



Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A redução do crescimento das plantas, em função da aplicação do eliciador, está diretamente envolvida com a reprogramação nas rotas metabólicas. O mecanismo de ação do eliciador requer um aumento na demanda por energia e esqueletos de carbono, fornecidos pelo metabolismo primário (CHAMNANMANOONTHAM et al., 2015). Os produtos do metabolismo primário (esqueletos de carbono e ATP), que seriam investidos em processos básicos de crescimento, como alocação de biomassa, são destinados para as vias de síntese de compostos secundários, resultando na supressão temporária do crescimento (CHONG et al., 2005). Esse desvio de rotas metabólicas foi observado, no presente estudo, onde a redução do número de folhas, perfilhos, área foliar e massa seca, provavelmente, está relacionada com o maior investimento dos produtos metabólicos, na síntese de estruturas de defesa e

compostos secundários, o que resultou em um menor investimento nos processos de crescimento.

A ação da quitosana, nos processos de crescimento e desenvolvimento, também, está associada à sua interação com hormônios vegetais específicos relacionados à defesa, como ácido jasmônico e ácido salicílico (IRITI et al., 2010). Além disso, esse polissacarídeo interage com certos componentes de sinalização da rota de síntese das giberelinas e auxina, sendo este último grupo pela via independente do triptofano, o que resulta em alterações no balanço hormonal endógeno da planta, prejudicando o crescimento das plantas (UTHAIRATANAKIJ; SILVA; OBSUWAN, 2007).

Corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho, Zaker et al. (2015) observaram que a ação dos eliciadores, no crescimento vegetal, tem uma relação dose-dependente e, também, varia com o tipo de eliciador utilizado. Nesse mesmo trabalho, o uso de polissacarídeos como a quitosana promoveu um efeito negativo sobre o crescimento radicular de *Perovskia abrotanoides*.

Estudos realizados com suspensões celulares de *Pueraria candolei*, mostraram que a quitosana (50 mg L<sup>-1</sup>), aplicada na fase pré-exponencial da curva de crescimento, causou redução significativa no crescimento celular (KORSANGRUANG et al., 2010). Resultados semelhantes foram obtidos com *Salvia miltiorrhiza*, cujo efeito do eliciador suprimiu o crescimento, reduzindo o rendimento de biomassa em até 50%, em relação ao controle (ZHAO; ZHOU; WU, 2010).

Apesar dos resultados obtidos no presente estudo, o eliciador quitosana é considerado um potencializador do crescimento vegetal, sendo, constantemente, utilizado para incrementar a produção em espécies agrícolas (UTHAIRATANAKIJ; SILVA; OBSUWAN, 2007). Em culturas como trigo, a quitosana, na concentração de 75 mg L<sup>-1</sup>, promoveu um aumento no

crescimento e rendimento total da cultura (WANG et al., 2015). No arroz, o tratamento com quitosana (40 mg L<sup>-1</sup>; 80% de desacetilação e baixo peso molecular) estimulou, significativamente, o crescimento das mudas, em termos de massa fresca, peso seco, altura da planta e comprimento da raiz. Comprovando que a capacidade de induzir alterações no crescimento das plantas depende, também, de suas propriedades físico-químicas (CHAMNANMANOONTHAM et al., 2015). Em *Gerbera jamesonii*, a quitosana aumentou, de forma significativa, os valores médios de número e comprimento de flores, número de folhas, incluindo a altura e o comprimento das folhas (WANICHPONGPAN; SURIYACHAN; CHANDRKRACHANG, 2001).

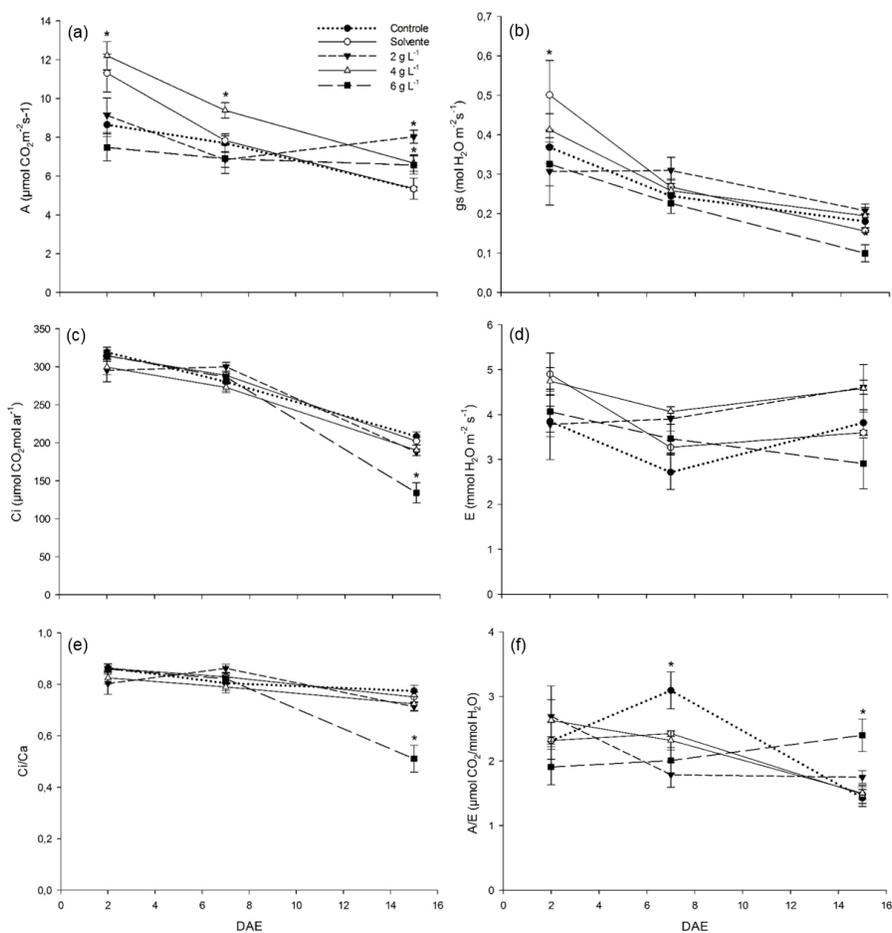
Além dos seus efeitos no crescimento vegetal, a quitosana pode ser utilizada para aumentar a produção de metabólitos secundários específicos. A aplicação de quitosana, em espécies oleaginosas como o girassol, intensificou a síntese de metabólitos secundários bioativos, como fenilpropanoides, isoprenoides e compostos indólicos e aumentou, de forma expressiva, o crescimento e a produtividade da cultura (CHO; NO; PRINYAWIWATKUL, 2008).

#### **4.2 Trocas gasosas**

A aplicação de quitosana na concentração de 4 g L<sup>-1</sup> gerou melhores resultados de fotossíntese líquida (A), nos dois primeiros tempos de avaliação (2º e 7º dia), em relação aos outros tratamentos; com exceção apenas do solvente, o qual não diferiu, estatisticamente, do tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> no primeiro dia de avaliação. No 15º dia, os tratamentos com 2, 4 e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana apresentaram maiores taxas fotossintéticas em relação ao controle e ao solvente (Figura 8A).

A condutância estomática (gs) foi maior nos tratamentos com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana e, no solvente, no 2º dia, após elicitação. Entretanto, o tratamento com 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana, na última avaliação, apresentou um decréscimo na condutância (Figura 8B) e no carbono interno (Ci) (Figura 8C), resultando, conseqüentemente, em uma menor razão Ci/Ca (Figura 8E). Os valores de transpiração não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 8D) e a eficiência instantânea do uso da água foi maior no controle (7º dia) e no tratamento com 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana no 15º dia após a elicitação (Figura 8F).

Figura 8 - Análises de trocas gasosas realizadas em folhas de *A. millefolium* nos tratamentos controle (sem elicitar), solvente (ácido acético 0,25%) e quitosana 2, 4 e 6 g L<sup>-1</sup>.



Legenda: (a) atividade fotossintética (A), (b) condutância estomática (gs), (c) concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (Ci), (d) taxa de transpiração (E), (e) razão entre concentrações de CO<sub>2</sub> intra/extracelular (Ci/Ca), (f) eficiência instantânea do uso da água (A/E). DAE: dias após elicitação. Os (\*) indicam valores que diferiram significativamente dos demais tratamentos, pelo teste de Scott-Knot ao nível de 5% de probabilidade.

O aumento expressivo, na fotossíntese líquida, observado no tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, no 2º e 7º dia, pode estar relacionado com o aumento na demanda energética. A síntese de estruturas de defesa como tricomas e determinados metabólitos secundários requer grandes quantidades de ATP e esqueletos de carbono que serão utilizados, para construção dessas novas estruturas/moléculas e, para compensar o gasto energético, o metabolismo da planta intensifica os processos primários como fotossíntese e respiração. Em outras culturas como o quiabo, a aplicação sequencial de quitosana (125 ppm), também, aumentou a taxa fotossintética líquida da cultura (MONDAL et al., 2012). Resultados similares foram observados em soja e milho, onde a aplicação de quitosana promoveu um aumento na fotossíntese líquida de 18% e 10% respectivamente (KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2002).

Além do seu efeito na fotossíntese, a quitosana é considerada um potente antitranspirante por promover o fechamento estomático. Desta forma, esse eliciador é capaz de aumentar a resistência estomática e reduzir a transpiração, melhorando, conseqüentemente, a eficiência do uso da água (LUDWIG et al., 2010). A ação antitranspirante da quitosana é mediada pelo ABA, cuja síntese pode aumentar até três vezes após a aplicação foliar do eliciador (IRITI et al., 2009). O mecanismo de fechamento estomático, dependente de ABA, está associado com alterações em sua rota de síntese, uma vez que a quitosana regula, positivamente, a dioxigenase 9-cis-epoxycarotenoide (NCED), uma enzima chave na biossíntese do ABA (IRITI et al., 2009; THOMPSON et al., 2000). Além de aumentar os níveis endógenos do ABA, a quitosana induz um aumento no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células guarda, um componente de sinalização necessário durante o mecanismo de fechamento estomático (IRITI et al., 2009; KOERS et al., 2011).

Apesar de atuar, reduzindo a abertura estomática, as concentrações de quitosana, utilizadas no presente estudo, não promoveram redução na gs, apenas

o tratamento com  $6 \text{ g L}^{-1}$  de quitosana, no 15º após a elicitación, apresentou redução na condutância. O resultado observado para a gs pode estar relacionado com as concentrações utilizadas, as quais não foram suficientes para promover alterações no mecanismo de fechamento estomático.

A aplicação de quitosana (0,15%), em folhas de feijão, reduziu a transpiração de forma similar aos antitranspirantes comerciais (LUDWIG et al., 2010). Em Piper (*Capsicum* sp.), a quitosana ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) induziu o fechamento estomático, o que resultou em uma menor condutância e transpiração, porém, mantendo a fotossíntese líquida semelhante ao controle. Neste estudo, a quitosana reduziu a perda de água, mantendo a produção de biomassa estável, sugerindo que o eliciador pode ser empregado na agricultura como um antitranspirante eficaz para otimizar o uso da água (BITTELLI et al., 2001).

Apesar dos resultados descritos na literatura, a aplicação de quitosana (2 e  $4 \text{ g L}^{-1}$ ) em folhas de *Achillea* não promoveu grandes alterações nos valores de condutância, transpiração e uso eficiente da água. Esses resultados podem estar relacionados com as concentrações empregadas e com o curto tempo de exposição ao eliciador, uma vez que alguns dos trabalhos, que utilizaram a quitosana com a finalidade de antitranspirante, realizaram aplicações sequenciais.

Os resultados aqui obtidos confirmam que houve um desvio de rotas metabólicas, pois os produtos, formados pelo processo de fotossíntese, foram direcionados para a síntese de componentes de defesa. Esse desvio de rotas metabólicas foi, claramente, observado no tratamento com  $4 \text{ g L}^{-1}$  de quitosana, onde houve um aumento significativo na fotossíntese líquida, porém, as plantas apresentaram redução no crescimento, provavelmente, porque os produtos, provenientes da fotossíntese, foram investidos no mecanismo de defesa da planta.

### 4.3 Quantificação dos anexos da epiderme

A densidade estomática na face adaxial da folha não sofreu alterações, em função da aplicação do eliciador, visto que não houve diferenças significativas nessa característica entre os tratamentos (Figura 9A-F). No entanto, na face abaxial da folha, foi observado um aumento significativo na densidade estomática no tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana (Tabela 1). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (Figura 10A-F).

Tabela 1 - Caracterização da superfície foliar de *A. millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana.

Tratamentos (quitosana)	DE (adaxial)	DE (abaxial)
Controle	10,37 a	102,86 b
Solvente	15,56 a	99,02 b
2 g L <sup>-1</sup>	14,52 a	91,36 b
4 g L <sup>-1</sup>	13,66 a	123,77 a
6 g L <sup>-1</sup>	15,30 a	97,50 b

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade. DE: densidade de estômatos (nº estômatos/mm<sup>2</sup>).

Os estômatos são anexos epidérmicos que desempenham um papel relevante no processo fotossintético, garantindo a adaptação das plantas em diferentes ecossistemas e condições climáticas. Eles regulam as trocas gasosas da planta, com o ambiente externo, com entrada do CO<sub>2</sub> no mesofilo foliar e saída de vapor de água para atmosfera (CHAERLE; SAIBO; STRAETEN, 2005).

O controle da abertura e fechamento estomático é uma estratégia fisiológica imediata que permite alterar a condutância estomática em função das condições ambientais (ROELFSEMA; HEDRICH, 2005). Uma segunda estratégia, utilizada pelas plantas, para adaptar às condições ambientais prolongadas, é a modulação na frequência de desenvolvimento dos estômatos.

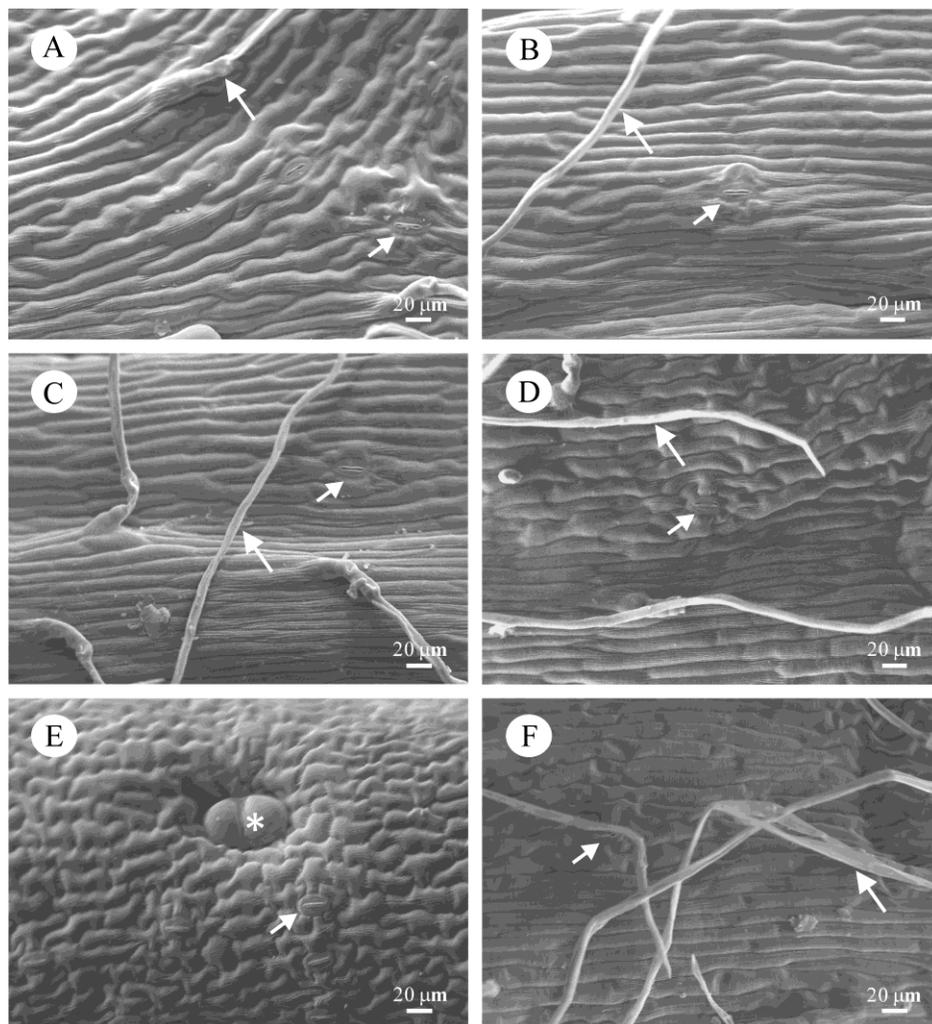
Alterações na frequência dos estômatos podem ocorrer tanto pelo aumento quanto pela redução na densidade estomática por unidade de área foliar (CASSON; GRAY, 2008).

Estímulos externos como luz, concentração de CO<sub>2</sub> e moléculas sinalizadoras endógenas como hormônios (GA, etileno), peptídeos e RNAs podem modular a frequência estomática na folha (CASSON; GRAY, 2008). A alteração, na frequência dos estômatos, é desencadeada pela percepção e transdução dos sinais ambientais. Folhas maduras são responsáveis por detectar as alterações, nas condições ambientais e gerar um sinal de longa distância, que é percebido pelas folhas jovens as quais irão direcionar a frequência estomática. (CASSON; GRAY, 2008; CASSON; HETHERINGTON, 2010).

Embora os fatores ambientais e moléculas sinalizadoras como a quitosana sejam conhecidos, por afetar a abertura estomática, muito pouco se sabe sobre os seus efeitos na frequência de desenvolvimento dos estômatos (CASSON; GRAY, 2008). O desenvolvimento das células estomáticas é regulado por diferentes mecanismos fisiológicos, variáveis como trocas gasosas possuem uma correlação direta com o índice estomático. Em *Populus trichocarpa*, a condutância estomática de folhas maduras apresentou um forte efeito regulador sobre a densidade estomática de folhas em expansão (MIYAZAWA; LIVINGSTON; TURPIN, 2006).

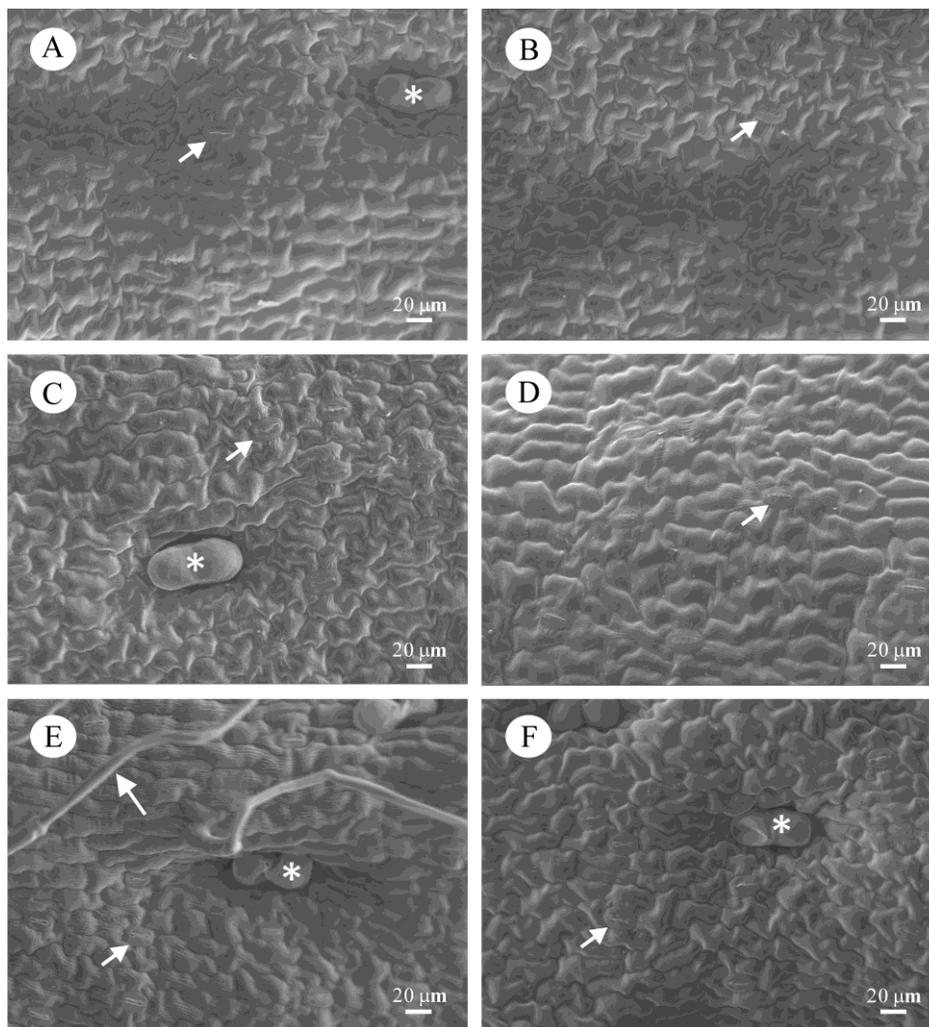
Deste modo, é provável que outros fatores que influenciam a condutância estomática como a quitosana, tenham influenciado a densidade de estômatos de folhas em desenvolvimento. A densidade estomática foi maior no tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, na face abaxial e o aumento dessa variável pode estar relacionado com a maior condutância obtida após a aplicação do eliciador.

Figura 9 - Eletromicrografias de varredura das superfícies adaxial do limbo foliar de *Achillea millefolium*.



Legenda: A e B- Controle. C- Solvente. D- 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana. E- 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana. F- 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana. Setas grandes indicam tricomas tectores, asterisco indica tricoma glandular e setas pequenas indicam estômatos.

Figura 10 - Eletromicrografias de varredura das superfícies abaxial do limbo foliar de *Achillea millefolium*.



Legenda: A e B- Controle. C- Solvente. D- 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana. E- 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana. F- 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana. Seta grande indica tricoma tector, asteriscos indicam tricomas glandulares e setas pequenas indicam estômatos.

A densidade de tricomas glandulares e tectores foi, diretamente, influenciada pela aplicação do eliciador. Na região adaxial da folha, a densidade de tricomas tectores foi maior no tratamento com o solvente e reduziu,

drasticamente, nos tratamentos com 2 e 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana. Em contrapartida, a densidade de tricomas glandulares foi maior nos tratamentos com 2 e 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, respectivamente (Tabela 2).

Na superfície abaxial, o número de tricomas tectores foi maior nos tratamentos com 2 e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana, os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas. A densidade de tricomas glandulares foi maior nas plantas elicidadas com 4 e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização da superfície foliar de *A. millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana.

Tratamentos (quitosana)	Adaxial		Abaxial	
	DTT	DTG	DTT	DTG
Controle	7,79 b	0,79 c	0,46 b	2,40 b
Solvente	9,77 a	0,95 c	0,37 b	2,03 b
2 g L <sup>-1</sup>	5,50 c	2,12 b	1,67 a	1,91 b
4 g L <sup>-1</sup>	2,40 d	2,98 a	0,76 b	3,05 a
6 g L <sup>-1</sup>	7,97 b	0,32 c	1,51 a	2,89 a

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade. DTT: densidade de tricomas tectores (nº tricomas/mm<sup>2</sup>), DTG: densidade de tricomas glandulares (nº tricomas/mm<sup>2</sup>).

Os tricomas fazem parte de duas linhas de defesa nas plantas, a primeira corresponde aos mecanismos constitutivamente expressos e a segunda àqueles que são induzidos após o ataque de um herbívoro ou patógeno (GLAS et al., 2012). As respostas induzidas envolvem alterações bioquímicas no metabolismo secundário como, por exemplo, o reforço de lignina nas paredes celulares, redução na qualidade nutricional da planta, emissão de compostos voláteis e aumento na densidade de estruturas de defesa como tricomas (BOUGHTON; HOOVER; FELTON, 2005; TRAW; BERGELSON, 2003). Danos mecânicos ou ataques de herbívoros/patógenos ativam os mecanismos de defesa da planta incluindo o aumento na via de biossíntese do ácido jasmônico (JA). O JA altera

a expressão dos genes de defesa, além de estar ligado com a síntese e desenvolvimento dos tricomas e, parte do mecanismo de ação da quitosana, envolve a ativação da via de síntese do JA, o que resulta no aumento da densidade de tricomas nas folhas recém-formadas (GOZZO; FAORO, 2013; KANT et al., 2004; TRAW; DAWSON, 2002).

A aplicação exógena de outros eliciadores como o metil jasmonato altera de forma expressiva a densidade de tricomas em folhas jovens. Por exemplo, plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate), tratadas com metil jasmonato (7,5 mM), aumentaram cerca de nove vezes a densidade de tricomas glandulares em relação ao controle (BOUGHTON; HOOVER; FELTON, 2005). Em *Arabidopsis thaliana*, o tratamento com JA, também, aumentou, significativamente, o número de tricomas glandulares, ao passo que o ácido salicílico diminuiu o número de tricomas (TRAW; BERGELSON, 2003).

Estímulos com estresses adversos tais como, danos mecânicos, aplicação de NaCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, também, alteram a densidade de tricomas em folhas novas (KJAER; GREVSEN; JENSEN, 2012). Tendo em vista a influência dessas formas de estresse, o aumento na densidade de tricomas tectores, no tratamento com o solvente (face adaxial), pode estar relacionado com a ativação dos mecanismos de defesa, em função do estresse gerado, após a aplicação do ácido na superfície foliar.

O uso de polissacarídeos como a quitosana tem apresentado resultados promissores para estimular o aumento de tricomas tectores e glandulares. A aplicação de quitosana (200 mg L<sup>-1</sup>), em folhas de *Artemisia annua* em desenvolvimento, promoveu um aumento significativo na densidade de tricomas glandulares (KJAER; GREVSEN; JENSEN, 2012). De maneira semelhante, os tratamentos com quitosana (2, 4 e 6 g L<sup>-1</sup>), utilizados neste trabalho, aumentaram, significativamente, a densidade de ambos os tricomas, destacando o tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana. Essa concentração aplicada foi ideal para

estimular o aumento na densidade de tricomas glandulares tanto na face adaxial quanto na abaxial.

Os tratamentos com 2 e 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana apresentaram resultados contrastantes na densidade de tricomas tectores e glandulares, ao passo que a densidade de tricomas glandulares aumentou, a densidade de tricomas tectores reduziu de forma expressiva. Esse padrão de resposta é conhecido como “trade-off” e implica que a alocação de recursos para um tipo de defesa ocorre à custa de outros mecanismos de defesas (ROJO; SOLANO; SANCHEZ-SERRANO, 2003).

O desvio de recursos, entre os mecanismos de defesa, já foi verificado após a aplicação de outros eliciadores como os jasmonatos. Em tomate, o JA induziu a expressão do gene que codifica a enzima anti-herbivoria polifenoloxidase, mas reduziu a expressão dos genes que codificam as proteínas PR relacionadas com patogênese (THALER et al., 1999). A resposta de trade-off, entre dois tipos de tricomas, foi, também, observada em poaceae, em que a aplicação de metil jasmonato (0,4 mM) promoveu o aumento na densidade de tricomas glandulares, porém, reduziu o número de glândulas de sal, um outro tipo de tricoma envolvido na tolerância à salinidade (KOBAYASHI; YANAKA; IKEDA, 2010).

Apesar de tricomas glandulares e tectores fazerem parte do mecanismo de defesa, ambos apresentaram resultados contrastantes em relação à densidade e isto pode estar relacionado com a especificidade de defesa de tais estruturas. Os tricomas glandulares estão mais relacionados com a proteção contra agentes patogênicos. Já os tricomas tectores são importantes na defesa contra insetos herbívoros. Neste caso, o aumento de tricomas glandulares, em detrimento dos tectores, pode estar relacionado com os mecanismos de sinalização da quitosana. Esses resultados confirmam, mais uma vez, que os produtos, formados durante o processo fotossintético, foram direcionados para a síntese de estruturas de defesa

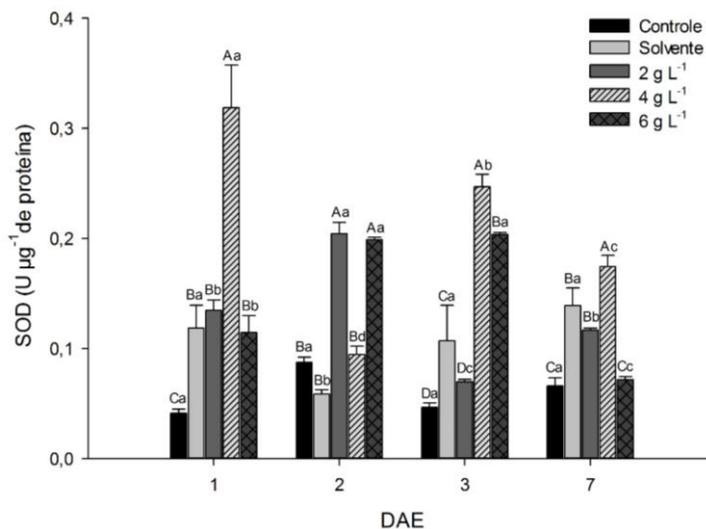
como os tricomas glandulares, por esse motivo, o aumento da fotossíntese líquida não foi acompanhado por um aumento no crescimento da planta.

#### **4.4 Análise da atividade do sistema antioxidante enzimático e atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL)**

A aplicação de quitosana promoveu aumento na atividade de todas as enzimas do sistema antioxidante. Com relação à atividade da Dismutase do superóxido (SOD), observou-se que, no 1º dia após a elicitação das plantas, os tratamentos com o solvente e quitosana (2 e 6 g L<sup>-1</sup>) promoveram um aumento na atividade da enzima em relação ao controle (Figura 11). No entanto, as plantas tratadas com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana foram as que apresentaram a maior atividade da SOD. No 2º dia após a elicitação, houve uma redução na atividade da SOD no tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, o qual apresentou valores semelhantes ao controle. Entretanto, os tratamentos, com 2 e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana, apresentaram os maiores valores da atividade da SOD.

No 3º dia após a elicitação, foi verificado um aumento na atividade da SOD, nas plantas tratadas com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, em relação ao período anterior, além disso, esse tratamento promoveu maior atividade da enzima em relação aos demais tratamentos. Ressalta-se, ainda, que o tratamento com 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana manteve-se constante, quando comparado ao período anterior e apresentou maior valor de atividade da SOD, em contraste com os tratamentos controle, solvente e 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana. No 7º dia de elicitação, a atividade da SOD reduziu nos tratamentos com 4 e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana, em relação ao período de 3 dias, porém as plantas, tratadas com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, exibiram maior atividade da enzima quando comparado com os demais tratamentos. As plantas tratadas com 6 g L<sup>-1</sup> apresentaram redução na atividade da SOD, com valores iguais ao controle. Os tratamentos com 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana e o solvente apresentaram valores de atividade semelhantes (Figura 11).

Figura 11 - Atividade específica da Dismutase do superóxido (SOD) em folhas de *A. millefolium*.



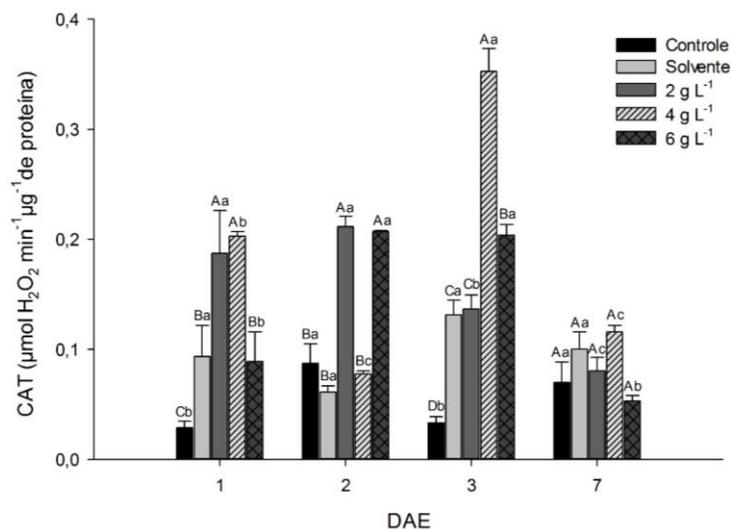
Legenda: DAE: dias após elicitação. Letras maiúsculas comparam dentro de cada tempo e letras minúsculas comparam o tratamento ao longo do tempo. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação à Catalase (CAT), no 1º dia após a elicitação, todos os tratamentos com quitosana e o solvente promoveram aumento em sua atividade em relação ao controle (Figura 12). Entretanto, os tratamentos com 2 e 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana promoveram maior atividade da enzima. No 2º dia de elicitação, foi observado um aumento na atividade da CAT, nas plantas tratadas com 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana, atingindo valores iguais ao tratamento com 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana. Resultados contrários foram observados, para as plantas do tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, pois apresentaram uma redução na atividade da CAT, com valor semelhante ao controle.

No 3º dia de elicitação, houve um aumento significativo na atividade da CAT, em plantas tratadas com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, em relação a todos os tempos de avaliação, em todos os tratamentos nesse mesmo período. Além

disso, observou-se que as plantas tratadas com 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana apresentaram valores de atividade da CAT iguais aos encontrados no 2º dia após a elicitação. Desta forma, os tratamentos com 4 e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana apresentaram maior atividade da CAT quando comparados com o solvente e 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana. No 7º dia após a elicitação, foi verificada uma redução na atividade da CAT, nos tratamentos com 2, 4 e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana, em relação aos períodos anteriores, atingindo valores iguais ao controle (Figura 12).

Figura 12 - Atividade específica da Catalase (CAT) em folhas de *A. Millefolium*.



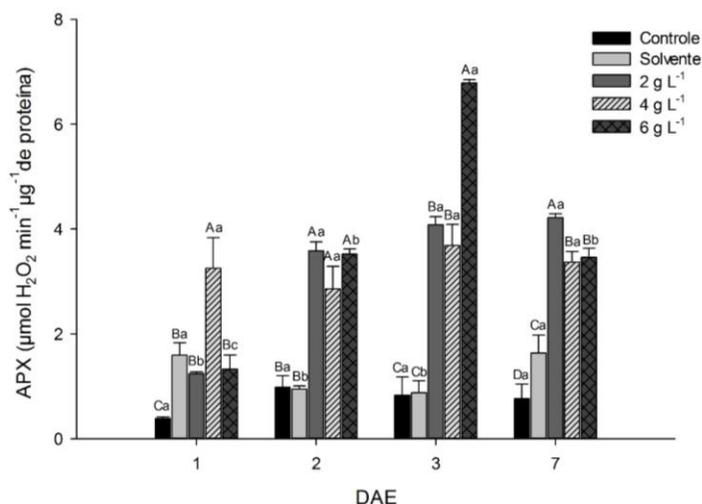
Legenda: DAE: dias após elicitação. Letras maiúsculas comparam dentro de cada tempo e letras minúsculas comparam o tratamento ao longo do tempo. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação à atividade da Peroxidase do ascorbato (APX), no 1º dia de elicitação, os tratamentos com quitosana e solvente promoveram um aumento significativo na atividade dessa enzima, em relação a plantas do controle (Figura 13). Entretanto, o tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana foi o que apresentou

maior atividade da APX. No 2º dia após a elicitação, as plantas tratadas com quitosana (2, 4 e 6 g L<sup>-1</sup>) exibiram maior atividade da APX em relação às plantas do controle e do solvente. Além disso, pode-se observar que as plantas tratadas com 2 e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana apresentaram um incremento na atividade da APX em comparação com o período anterior.

No 3º dia após a elicitação, as plantas tratadas com 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana apresentaram um aumento na atividade da APX em relação a todos os tempos analisados e aos demais tratamentos nesse período. No entanto, os tratamentos controle, solvente e quitosana 2 e 4 g L<sup>-1</sup> exibiram valores constantes da atividade dessa enzima. No 7º dia após a elicitação, constatou-se uma redução na atividade da APX, em plantas tratadas com 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana, em relação ao 3º dia de elicitação, atingindo (no 7º dia) valores iguais aos das plantas tratadas com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana. Observou-se, ainda, um aumento na atividade da APX em plantas tratadas com 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana, as quais apresentaram maior atividade da enzima nesse período de avaliação (Figura 13).

Figura 13 - Atividade específica da Peroxidase do ascorbato (APX) em folhas de *A. Millefolium*.



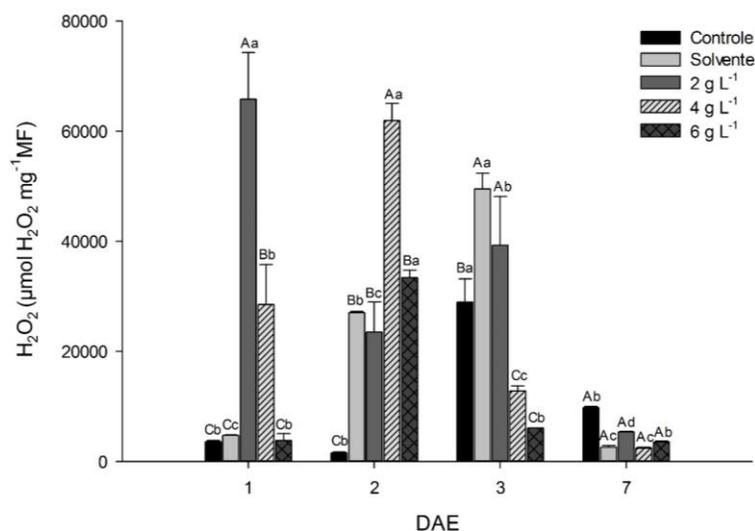
Legenda: DAE: dias após elicitação. Letras maiúsculas comparam dentro de cada tempo e letras minúsculas comparam o tratamento ao longo do tempo. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Além das alterações na atividade das enzimas do sistema antioxidante, os tratamentos com quitosana influenciaram nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 14). No 1º dia após a elicitação, foi possível verificar um aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tratamento com 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana, seguido do tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana. As plantas do controle, solvente e quitosana 6 g L<sup>-1</sup> não apresentaram diferenças significativas nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No 2º dia após a elicitação, as plantas, tratadas com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, apresentaram um aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em relação ao período anterior e esse tratamento promoveu um maior acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nesse período. Além disso, as plantas, que foram elicidadas com 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana, apresentaram níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduzidos, com valores iguais às plantas tratadas com solvente e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana.

No 3º dia após a elicitação, as plantas tratadas com 4 e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana apresentaram níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduzidos, enquanto aquelas tratadas

com solvente e 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana exibiram um aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação com o período anterior. Portanto, nesse período, os maiores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram observados nas plantas tratadas com solvente e 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana. No 7º dia decorrente à elicitação, os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em todos os tratamentos, foram reduzidos a valores iguais ao controle (Figura 14).

Figura 14 - Teor de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em folhas de *A. Millefolium*.

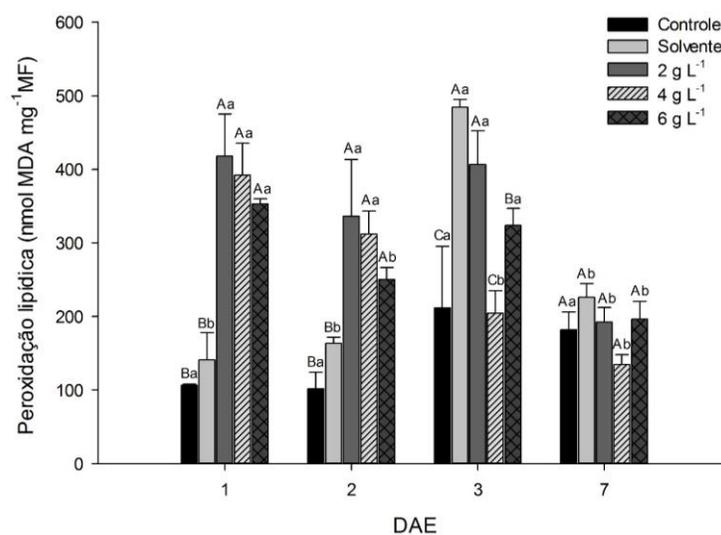


Legenda: DAE: dias após elicitação. Letras maiúsculas comparam dentro de cada tempo e letras minúsculas comparam o tratamento ao longo do tempo. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Quanto aos valores de peroxidação lipídica, no 1º dia após a elicitação, as plantas tratadas com quitosana apresentaram níveis elevados de malondialdeído sem diferenças entre si (Figura 15). O mesmo comportamento foi observado no 2º dia de elicitação. No entanto, as plantas tratadas com 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana reduziram os níveis de peroxidação em relação ao período anterior. No 3º dia de elicitação, as plantas tratadas com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana apresentaram redução na peroxidação lipídica, com valores semelhantes ao

controle, enquanto o tratamento com o solvente apresentou valores iguais aos das plantas tratadas com 2 g L<sup>-1</sup> de quitosana. No 7º dia após a elicitação, foi observado um reajuste metabólico, uma vez que a peroxidação lipídica, em todos os tratamentos, foi reduzida aos níveis do controle. Portanto, a elicitação provocou danos na célula, nos primeiros dias após a aplicação do eliciador e, provavelmente, do 7º dia em diante os danos foram reparados e a homeostase redox da célula controlada.

Figura 15 - Peroxidação lipídica em folhas de *A. millefolium*.



Legenda: DAE: dias após elicitação. Letras maiúsculas comparam dentro de cada tempo e letras minúsculas comparam o tratamento ao longo do tempo. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O tratamento com quitosana promoveu aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante, nos níveis de  $H_2O_2$  e peroxidação lipídica, principalmente, no tratamento com  $4\text{ g L}^{-1}$ . É importante ressaltar que o acúmulo de  $H_2O_2$  e o aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante são eventos desencadeados pela aplicação de quitosana (LEI et al., 2011).

Após a eliciação, ocorre a percepção do eliciador pelo receptor específico de membrana e a ligação ao receptor ativa uma complexa cascata de sinalização (AGURLA; GAYATRI; RAGHAVENDRA, 2014; HANN et al., 2014) envolvendo a ativação da enzima NADPH-oxidase. Essa enzima é responsável pela redução do  $O_2$  molecular ao ânion superóxido ( $O_2^{*-}$ ) que, posteriormente, é desmutado pela SOD a  $H_2O_2$ , promovendo uma explosão oxidativa, esse é o ponto inicial da rota de transdução de sinal (LEHMANN et al., 2015).

Como parte do mecanismo de sinalização, ocorre a abertura dos canais de cálcio e o influxo transitório de cálcio, esse mensageiro secundário juntamente com  $H_2O_2$  ativam a enzima óxido nítrico sintase. O  $Ca^{2+}$ , óxido nítrico e  $H_2O_2$  são sinalizadores que ativam a cascata de MAP kinases, alterando a expressão de genes relacionados à síntese de enzimas hidrolíticas, lignina e compostos secundários importantes no mecanismo de defesa da planta como flavonoides, taninos e determinados terpenos (AGURLA; GAYATRI; RAGHAVENDRA, 2014; LEHMANN et al., 2015).

No entanto, após a geração da resposta, é necessário o reajuste metabólico dos níveis de EROs e esse reajuste é conseguido pela ação das enzimas do sistema antioxidante SOD, CAT e APX. A SOD possui uma dupla função, durante a eliciação, pois essa enzima é importante, para amplificação do sinal pela formação do  $H_2O_2$  e, também, é responsável por eliminar o  $O_2^{*-}$ . O superóxido é uma EROs altamente reativa que pode promover diversos danos à célula, assim como o  $H_2O_2$  que, apesar de ser um sinalizador em baixas

concentrações, em altas concentrações ele pode reagir com membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em sérios danos fisiológicos (MITTLER, 2002).

Assim, após a amplificação da resposta, ocorre um aumento na atividade das enzimas CAT e APX, as quais convertem o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ , livrando rapidamente a célula do efeito danoso dessas EROs. Como observado neste trabalho, no 1º dia após a elicitação, houve um aumento na atividade da SOD nos tratamentos com quitosana, principalmente, nas plantas tratadas com  $4\text{ g L}^{-1}$ , seguido de uma queda no 2º dia e mantendo-se novamente alta até o 7º dia de elicitação. Esses resultados são semelhantes aos observados em *Artemisia annua*, em que a aplicação foliar de quitosana promoveu um aumento na atividade da SOD e no acúmulo de  $H_2O_2$  nas primeiras horas após a elicitação (LEI et al., 2011).

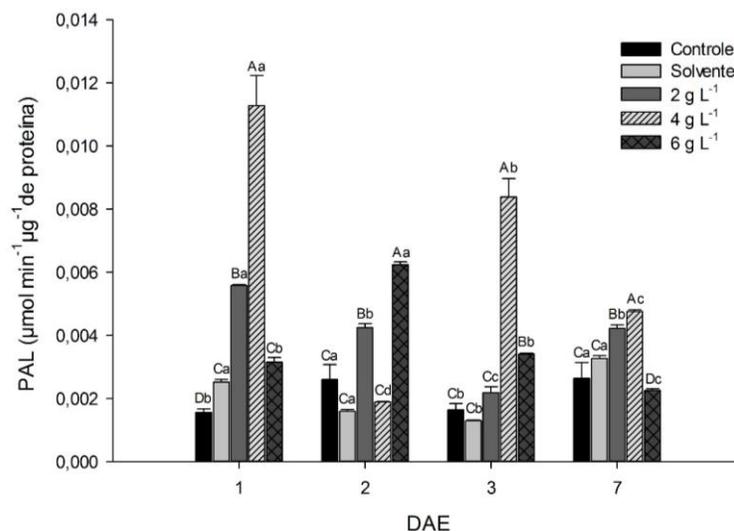
Isso explica o padrão observado, para o comportamento da CAT, a qual teve sua atividade aumentada em concentrações mais altas de  $H_2O_2$  que, por sua vez, é gerado pela SOD. Assim, o aumento na atividade da CAT promoveu, de modo geral, redução nos níveis de  $H_2O_2$ , o que justifica a atividade da APX que se manteve, praticamente, constante em todos os períodos analisados, pois essa enzima atua em baixas concentrações de  $H_2O_2$ . Semelhante ao observado neste trabalho, Lei et al. (2011) verificaram um aumento na atividade da CAT juntamente com a APX, 24 horas após a aplicação de quitosana em *Artemisia annua*. Pode-se observar, ainda, que a atividade das enzimas do sistema antioxidante foi eficiente, para o ajustamento redox da célula, conseguido no 7º dia após a elicitação, pois, nesse período, os níveis de peróxido e peroxidação lipídica foram iguais aos encontrados nas plantas do controle.

Esses resultados podem justificar o aumento no teor do óleo essencial, encontrado nas plantas elicitadas com  $4\text{ g L}^{-1}$  de quitosana, uma vez que essa concentração promoveu um maior teor de  $H_2O_2$  e, conseqüentemente, a ativação

dos mecanismos de defesa de forma eficaz. Além disso, a concentração de  $4 \text{ g L}^{-1}$  de quitosana promoveu maior indução do sistema de defesa contra os danos oxidativos, constatado pelo aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante e menor peroxidação lipídica, o que pode ter corroborado para o melhor desempenho fisiológico dessas plantas quanto à produção de compostos de defesa voláteis.

A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) foi influenciada pela aplicação de quitosana (Figura 16). O tratamento com  $4 \text{ g L}^{-1}$  de quitosana proporcionou maior atividade da PAL durante três tempos de avaliação (1º, 3º e 7º dia). Nos demais tratamentos ( $2$  e  $6 \text{ g L}^{-1}$ ), a atividade da enzima foi menor. Esses resultados demonstram que a concentração de  $4 \text{ g L}^{-1}$  foi eficaz para promover o aumento de sua atividade.

Figura 16 - Atividade da Fenilalanina amônia-liase (PAL) em folhas de *A. Millefolium*.



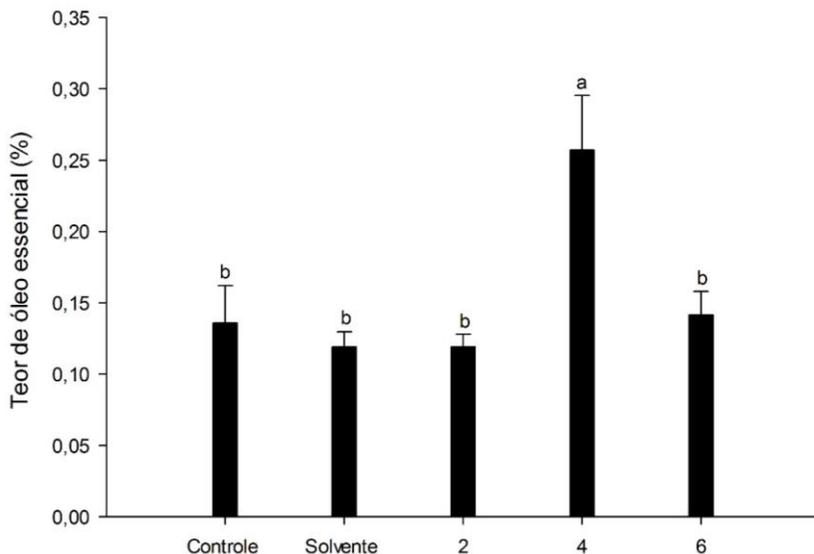
Legenda: DAE: dias após elicitação. Letras maiúsculas comparam dentro de cada tempo e letras minúsculas comparam o tratamento ao longo do tempo. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A PAL está relacionada com a síntese de vários compostos fenólicos, especialmente fenóis que atuam como antioxidantes. O aumento na atividade da PAL, nos tratamentos com quitosana, pode ter induzido um aumento no conteúdo dos fenóis totais, os quais auxiliam na remoção das EROs e no controle da homeostase redox da célula, além de fazerem parte dos mecanismos de defesa da planta acionados pela quitosana. Os resultados obtidos, no presente estudo, são corroborados pelos trabalhos realizados por Mandal (2010) e Sedigheh et al. (2012), em que a aplicação de quitosana promoveu um aumento na atividade da PAL.

#### 4.5 Produção e composição química do óleo essencial

O teor do óleo essencial foi influenciado pela aplicação do eliciador. O maior teor de óleo foi obtido no tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (Figura 17).

Figura 17 - Teor do óleo essencial (%) de *A. millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana (2, 4 e 6 g L<sup>-1</sup>), 90 dias após o transplante das mudas.



Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação ao rendimento do óleo essencial, notou-se que o tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana proporcionou um rendimento de 0,09% de óleo (Equação 3). Isso indica que, apesar desse tratamento ter promovido redução no crescimento da parte área de *Achillea millefolium* em 21%, quando comparado com plantas do controle, ele apresentou um

rendimento de 0,09% de óleo essencial em relação a plantas controle. Portanto, o tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana foi eficiente na promoção do aumento do rendimento do óleo essencial de *Achillea millefolium*.

$$\frac{((0,26\%) - (0,14\%)) - (3,85\text{g} - 3,03\text{g}) \cdot (0,14\%)}{3,85\text{g}} = 0,09\%$$

**Equação 3.** Rendimento do óleo essencial em folhas de *Achillea millefolium* tratadas com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana. TO cont, corresponde ao teor do óleo em plantas controle, TO trat x ao teor do óleo em plantas do tratamento x, sendo “x” representado pelo tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, uma vez que esse tratamento induziu maior teor de óleo essencial. MS cont, representa a massa seca das plantas controle e MS trat x representa a massa seca do tratamento x, em que “x” foi representado com as plantas do tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana.

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), vários fatores bióticos, abióticos e intrínsecos da planta podem afetar o conteúdo final de metabólitos secundários, em plantas medicinais, tais como o estágio de desenvolvimento, tipo de órgão, biociclo vegetal, temperatura, radiação, disponibilidade hídrica, danos mecânicos e moléculas eliciadoras.

O aumento no teor do óleo essencial, no tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana, está relacionado com os demais parâmetros fisiológicos observados, tais como, a redução do crescimento e o aumento da taxa fotossintética. Apesar da redução no crescimento, houve um aumento inicial na taxa fotossintética líquida, indicando que os esqueletos de carbono e ATP, formados no processo fotossintético, provavelmente, foram direcionados para as folhas em desenvolvimento, em que foram utilizados, na síntese de estruturas de defesa, bem como dos metabólitos secundários que constituem o óleo essencial.

O aumento da produção do óleo, nesse tratamento, também, pode estar relacionado com o aumento na densidade de tricomas glandulares, uma vez que

a produção do óleo essencial, geralmente, está associada à presença de estruturas secretoras especializadas, tais como tricomas glandulares, responsáveis por sintetizar e armazenar os constituintes do óleo (GLAS et al., 2012; LANGE, 2015).

Ao contrário do observado no presente estudo, em *Piper mollicomum*, a aplicação de quitosana ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) reduziu o teor de óleo essencial nas folhas e raízes, enquanto a menor concentração ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ) não alterou o teor do óleo nas folhas, mas aumentou nas raízes (DOUSSEAU, 2013). O uso de outros eliciadores como Metil jasmonato e nanopartículas de prata em folhas de *A. millefolium* promoveu um aumento no teor do óleo essencial e alterou os constituintes voláteis do óleo (GHANATI et al., 2014). Alterações no teor do óleo essencial estão associadas à plasticidade fisiológica da planta, que busca intensificar ou reduzir as rotas de síntese de compostos necessários a uma condição específica, como, por exemplo, durante o ataque de fungos patogênicos. A síntese de compostos como o borneol e  $\beta$ -cariofileno é intensificada, pois esses metabólitos atuam como agentes antimicrobianos naturais.

A composição química do óleo essencial de *Achillea millefolium* é bastante complexa, a análise de cromatografia gasosa possibilitou a identificação de 40 compostos voláteis, totalizando 95,17% do total dos constituintes (Tabela 3). O número dos constituintes, presentes no óleo, manteve-se, praticamente, constante entre os tratamentos. Dentre os compostos identificados, apenas o isobiciclogermacrenal e o eugenol foram encontrados nos tratamentos com quitosana e não estavam presentes no controle.

Os compostos majoritários (com áreas relativas maiores que 2%) encontrados no óleo foram: borneol (4,41-5,35%),  $\beta$ -cariofileno (5,47-6,52%),  $\beta$ -cubebeno (16,66-21,15),  $\alpha$ -farneseno (2,84-3,69%) e o camazuleno (30,07-40,52%). Esses constituintes apresentaram diferenças quantitativas entre os

tratamentos com diferentes concentrações de quitosana (Tabela 4). Os principais compostos majoritários, presentes no óleo, incluem monoterpenos (borneol) e sesquiterpenos ( $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -cubebeno,  $\alpha$ -farneseno, camazuleno).

Dentre os compostos majoritários, o maior teor de borneol (5,35% e 5,02%) foi observado no tratamento com 2 e 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana. O  $\beta$ -cariofileno apresentou maior teor (6,52%) nas plantas do controle. O  $\beta$ -cubebeno e  $\alpha$ -farneseno apresentaram maiores concentrações (21,15 e 3,69%, respectivamente) no tratamento com o solvente e o camazuleno (40,52%) no tratamento com 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana. Portanto, a aplicação do eliciador e, inclusive, do solvente promoveram alterações expressivas nas concentrações dos constituintes majoritários presentes no óleo.

Tabela 3 - Constituição química do óleo essencial de folhas de *Achillea millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana (área %  $\pm$  DP). Lavras, 2016. (Continua)

88

Compostos (%)	IR <sup>1</sup>	Tratamentos (área %)				
		Controle	Solvente	Quitosana (g L <sup>-1</sup> )		
				2 g L <sup>-1</sup>	4 g L <sup>-1</sup>	6 g L <sup>-1</sup>
Sabineno	972	0,34 $\pm$ 0,17	2,57 $\pm$ 1,56	0,21 $\pm$ 0,08	0,12 $\pm$ 0,04	—
Octen-3-ol	976	0,73 $\pm$ 0,10	0,83 $\pm$ 0,19	0,76 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,24	0,48 $\pm$ 0,02
1,8-Cineol	1030	0,79 $\pm$ 0,31	1,23 $\pm$ 0,57	0,85 $\pm$ 0,20	0,62 $\pm$ 0,21	0,47 $\pm$ 0,02
$\gamma$ -Terpineno	1057	0,28 $\pm$ 0,11	0,42 $\pm$ 0,20	0,30 $\pm$ 0,08	0,20 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,01
Hidrato de cis Sabineno	1065	0,81 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,04	0,69 $\pm$ 0,24	0,68 $\pm$ 0,03
Hidrato de trans Sabineno	1098	0,65 $\pm$ 0,10	0,67 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,16	0,60 $\pm$ 0,01
Borneol	1164	4,73 $\pm$ 0,14	4,59 $\pm$ 0,22	5,35 $\pm$ 0,01	5,02 $\pm$ 0,55	4,41 $\pm$ 0,01
Terpinen-4-ol	1176	1,38 $\pm$ 0,06	1,33 $\pm$ 0,06	1,81 $\pm$ 0,19	1,11 $\pm$ 0,17	1,21 $\pm$ 0,17
$\alpha$ -Terpineol	1190	1,47 $\pm$ 0,20	1,45 $\pm$ 0,04	1,74 $\pm$ 0,09	1,51 $\pm$ 0,13	1,21 $\pm$ 0,02
Acetato de Bornila	1285	0,27 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,01
Eugenol	1356	—	0,15 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,08
$\beta$ -Cariofileno	1418	6,52 $\pm$ 0,06	5,92 $\pm$ 0,34	5,91 $\pm$ 0,26	5,88 $\pm$ 0,58	5,47 $\pm$ 0,03
$\alpha$ -Humuleno	1452	1,02 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,02
$\beta$ -Cubebeno	1481	19,48 $\pm$ 3,08	21,15 $\pm$ 0,22	18,67 $\pm$ 1,15	16,66 $\pm$ 0,76	18,37 $\pm$ 1,23
( <i>E</i> )- $\beta$ -ionona	1485	0,26 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,05
Biciclogermacreno	1495	1,38 $\pm$ 0,13	1,48 $\pm$ 0,04	1,34 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,06	1,34 $\pm$ 0,10
$\alpha$ -Farneseno	1509	3,32 $\pm$ 0,22	3,69 $\pm$ 0,40	2,91 $\pm$ 0,21	2,84 $\pm$ 0,15	3,30 $\pm$ 0,35

Tabela 3 - Constituição química do óleo essencial de folhas de *Achillea millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana (área %  $\pm$  DP). Lavras, 2016. (Continuação)

Compostos (%)	IR <sup>1</sup>	Tratamentos (área %)				
		Controle	Solvente	Quitosana (g L <sup>-1</sup> )		
				2 g L <sup>-1</sup>	4 g L <sup>-1</sup>	6 g L <sup>-1</sup>
$\gamma$ -Cadineno	1523	0,56 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,05
Z-Nerolidol	1536	0,20 $\pm$ 0,10	0,21 $\pm$ 0,07	—	0,20 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,09
Óxido de aromadendreno	1565	0,73 $\pm$ 0,20	0,91 $\pm$ 0,13	0,80 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,05
E-Nerolidol	1570	0,20 $\pm$ 0,10	—	0,19 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,06	—
Espatulenol	1576	1,58 $\pm$ 0,32	3,03 $\pm$ 1,38	1,63 $\pm$ 0,11	1,95 $\pm$ 0,07	1,64 $\pm$ 0,03
Óxido de cariofileno	1581	1,97 $\pm$ 0,36	2,19 $\pm$ 0,40	1,68 $\pm$ 0,12	2,02 $\pm$ 0,14	1,71 $\pm$ 0,02
Salvial-4(14)-en-1-ona	1592	0,88 $\pm$ 0,28	0,75 $\pm$ 0,10	0,76 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,01
$\beta$ -Panasinsen-5 $\alpha$ -ol	1611	0,34 $\pm$ 0,17	0,27 $\pm$ 0,09	0,27 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,02
E-Isolongifolanona	1621	0,38 $\pm$ 0,09	0,36 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,04
Guaia-6,10(14)-dien-4- $\beta$ -ol	1637	0,35 $\pm$ 0,18	0,29 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,01
<i>t</i> -Muurolol	1641	0,64 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,02	0,64 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,07	0,46 $\pm$ 0,03
3-Hidróxido de cariofileno	1646	0,54 $\pm$ 0,10	0,53 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,02
$\alpha$ -Cadinol	1653	1,29 $\pm$ 0,11	1,31 $\pm$ 0,05	1,37 $\pm$ 0,05	1,36 $\pm$ 0,11	0,97 $\pm$ 0,05
Eudesma-4(15),7-dien-1- $\beta$ -ol	1678	0,66 $\pm$ 0,16	0,58 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,05
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-ol	1685	1,28 $\pm$ 0,23	1,09 $\pm$ 0,10	1,08 $\pm$ 0,08	1,18 $\pm$ 0,09	1,13 $\pm$ 0,09
Cadina-3,10(15)-dien-5 $\beta$ -ol	1689	0,20 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,06	—	0,18 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,09
Camazuleno	1730	31,05 $\pm$ 0,09	30,07 $\pm$ 0,93	37,17 $\pm$ 1,22	37,91 $\pm$ 0,59	40,52 $\pm$ 0,49

Tabela 3 - Constituição química do óleo essencial de folhas de *Achillea millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana (área %  $\pm$  DP). Lavras, 2016. (Conclusão)

Compostos (%)	IR <sup>1</sup>	Tratamentos (área %)				
		Controle	Solvente	Quitosana (g L <sup>-1</sup> )		
				2 g L <sup>-1</sup>	4 g L <sup>-1</sup>	6 g L <sup>-1</sup>
Isobiciclogermacrenal	1741	—	0,38 $\pm$ 0,13	—	0,27 $\pm$ 0,11	0,39 $\pm$ 0,19
<i>m/z</i> = 220	1764	1,03 $\pm$ 0,31	0,82 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,09	1,04 $\pm$ 0,10
3,4-Dimetilbifenil	1773	1,62 $\pm$ 0,17	1,30 $\pm$ 0,20	1,31 $\pm$ 0,13	1,80 $\pm$ 0,25	0,70 $\pm$ 0,02
14- $\alpha$ -Hidroxi-muuroleno	1776	0,36 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,02
14-Hidroxi- $\gamma$ -cadineno	1801	0,77 $\pm$ 0,14	0,70 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,02	0,75 $\pm$ 0,01
Geranyl linalool	2183	1,18 $\pm$ 0,08	1,35 $\pm$ 0,15	1,28 $\pm$ 0,03	1,56 $\pm$ 0,18	1,40 $\pm$ 0,50
Outros (%)		6,92	7,91	5,39	7,25	5,99
Constituintes identificados (%)		94,76	95,61	95,39	95,17	94,94
Nº de constituintes		38	39	37	40	38

<sup>1</sup>Índice de retenção relativo à série *n*-alcanos (C<sub>9</sub>-C<sub>25</sub>) em coluna HP-5MS na ordem de eluição.

DP: Desvio padrão (*n*=3), — Não identificado

Tabela 4 - Compostos majoritários (área %  $\pm$  DP) de *A. millefolium* L. após a aplicação de diferentes concentrações de quitosana. Plantas com 90 dias após o transplante das mudas. Lavras, 2016

Tratamentos (quitosana)	Borneol	$\beta$ -Cariofileno	$\beta$ -Cubebeno	$\alpha$ -Farneseno	Camazuleno
Controle	4,73 $\pm$ 0,14	6,52 $\pm$ 0,06	19,48 $\pm$ 3,08	3,32 $\pm$ 0,22	31,05 $\pm$ 0,09
Solvente	4,59 $\pm$ 0,22	5,92 $\pm$ 0,34	21,15 $\pm$ 0,22	3,69 $\pm$ 0,40	30,07 $\pm$ 0,93
2 g L <sup>-1</sup>	5,35 $\pm$ 0,01	5,91 $\pm$ 0,26	18,67 $\pm$ 1,15	2,91 $\pm$ 0,21	37,17 $\pm$ 1,22
4 g L <sup>-1</sup>	5,02 $\pm$ 0,55	5,88 $\pm$ 0,58	16,66 $\pm$ 0,76	2,84 $\pm$ 0,15	37,91 $\pm$ 0,59
6 g L <sup>-1</sup>	4,41 $\pm$ 0,01	5,47 $\pm$ 0,03	18,37 $\pm$ 1,23	3,30 $\pm$ 0,35	40,52 $\pm$ 0,49

\* DP: Desvio padrão ( $n=3$ ).

A aplicação de quitosana, também, provocou alterações nos constituintes terpênicos de outras espécies. Lei et al. (2011) verificaram que a aplicação foliar de quitosana (100mg L<sup>-1</sup>) em *Artemisia annua* intensificou a síntese do sesquiterpeno artemisinina em 53% superior ao controle. Em *Hypericum perforatum*, o uso deste eliciador estimulou as vias de síntese de fenilpropanoides e isoprenoides em raízes, resultando em um alto rendimento de metabólitos secundários específicos, tais como epicatequina, xantonas e estigmasterol (BRASIL et al., 2014). A quitosana (150mg L<sup>-1</sup>), também, foi eficaz para a indução da produção de compostos fenólicos antioxidantes *in vitro* em *Orthosiphon stamineus* (LIM et al., 2013).

No presente trabalho, observou-se que a quitosana alterou a concentração dos compostos terpênicos presentes no óleo de *A. millefolium*. De maneira geral, os sesquiterpenos majoritários apresentaram uma redução na concentração com o aumento nas doses de quitosana. Entretanto, o camazuleno, que é um sesquiterpeno majoritário do óleo, apresentou um aumento da sua produção em resposta ao acréscimo da aplicação de quitosana. A quitosana, nas concentrações de 4 e 6 g L<sup>-1</sup>, promoveu um aumento de 6,8% e 9,4%, respectivamente, na produção do camazuleno. Provavelmente, a diferença na concentração dos sesquiterpenos majoritários pode estar relacionada com o efeito da quitosana na expressão diferencial de genes envolvidos na biossíntese

dos terpenos (BRASIL et al., 2014; THOLL, 2006). As enzimas responsáveis pela síntese dos terpenos são denominadas terpeno-sintases, essa classe de enzimas pode facilmente adquirir novas propriedades catalíticas por pequenas alterações estruturais (KEELING et al., 2008), podendo, dessa forma, alterar a composição de terpenos no óleo.

## 5 CONCLUSÕES

A elicitação com quitosana promove uma explosão oxidativa, que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, e o aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante é necessário, para manter o equilíbrio redox celular e a recuperação dos danos causados nas membranas.

O tratamento com 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana induz um aumento na atividade da enzima PAL, o que pode estar relacionado com a síntese de compostos fenólicos envolvidos na defesa contra patógenos.

A aplicação de quitosana na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>, também, induz um aumento na taxa fotossintética, bem como no teor e rendimento do óleo essencial.

A concentração dos constituintes majoritários do óleo essencial é alterada pela elicitação, destacando o camazuleno, o qual apresenta um aumento de 6,8% e 9,4% nos tratamentos com 4 e 6 g L<sup>-1</sup> de quitosana, respectivamente.

Portanto, a concentração de 4 g L<sup>-1</sup> de quitosana é eficiente e indicada, para induzir o aumento no rendimento do óleo essencial de *Achillea millefolium*, pois, além de promover aumento na síntese dos constituintes voláteis, garante um bom desempenho fisiológico.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, n. 6, p. 407-426, Nov./Dec. 2010.
- AGURLA, S.; GAYATRI, G.; RAGHAVENDRA, A. S. Nitric oxide as a secondary messenger during stomatal closure as a part of plant immunity response against pathogens. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 43, p. 89-96, Dec. 2014.
- AKRAM, M. Minireview on *Achillea millefolium* Linn. **The Journal of Membrane Biology**, New York, v. 246, n. 9, p. 661-663, 2013.
- ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.
- ALVARENGA, I. C. A. **Lâminas de irrigação e omissão de nutrientes no cultivo *in vivo* e luz e TDZ na micropropagação e constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L.** 2013. 135 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- APPLEQUIST, W. L.; MOERMAN, D. E. Yarrow (*Achillea millefolium* L.): a neglected panacea?: a review of ethnobotany, bioactivity, and biomedical research. **Economic Botany**, Bronx, v. 65, n. 2, p. 209-225, June 2011.
- AYOUGHI, F. et al. Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracunculus* L. and endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their antioxidative effects. **Journal of Agricultural Science and Technology**, London, v. 13, n. 1, p. 79-88, Jan./Feb. 2011.
- BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARBER, M. S.; MITCHELL, H. J. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. **Internacional Review of Cytology**, New York, v. 172, p. 243-293, 1997.

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B. M. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, Guildford, v. 25, n. 2, p. 108-118, Feb. 2006.

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

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, 2004.

BORSATO, A. V. et al. Rendimento e composição química do óleo essencial da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] submetida à secagem à 70° C. **Semina: Ciências Agrárias**, Passo Fundo, v. 28, n. 4, p. 635-644, 2007.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 68, n. 22/24, p. 2722-2735, 2007.

BOUGHTON, A. J.; HOOVER, K.; FELTON, G. W. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 9, p. 2211-2216, Sept. 2005.

BRASIL. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, 2014 Disponível em:

<<http://www.plantasmedicinaisefitoterapia.com/mil-folhas-milefolio.html>>.

Acesso em: 12 nov. 2015.

BRASIL, E. et al. A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum* in vitro roots. **Metabolomics**, New York, v. 10, n. 6, p. 1186-1196, Nov. 2014.

CARL, J. D. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 1, n. 6, p. 171-178, 1996.

CARNEIRO, F. B. et al. Variação da quantidade de  $\beta$ -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista brasileira de Farmacognósia**, Curitiba, v. 20, n. 4, p. 600-606, 2010.

CASSON, S.; GRAY, J. E. Influence of environmental factors on stomatal development. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 1, p. 9-23, Apr. 2008.

CASSON, S. A.; HETHERINGTON, A. M. Environmental regulation of stomatal development. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 90-95, Feb. 2010.

CHAERLE, L.; SAIBO, N.; STRAETEN, D. van der. Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 6, p. 308-315, June 2005.

CHAMNANMANOONTHAM, N. et al. Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 75, n. 1, p. 101-114, Jan. 2015.

CHO, M. H.; NO, H. K.; PRINYAWIWATKUL, W. Chitosan treatments affect growth and selected quality of sunflower sprouts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 70-77, Jan. 2008.

CHONG, T. M. et al. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 11, p. 3397-3405, Nov. 2005.

COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3, p. 184-191, 2013.

DONG, J.; WAN, G.; LIANG, Z. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 148, n. 2/3, p. 99-104, July 2010.

DOUSSEAU, S. **Ação reguladora de eliciadores nas características bioquímicas, ecofisiológicas, anatômicas e na produção e qualidade de óleo essencial de *Piper mollicomum* Kunth**. 2013. 265 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

FAZAL, H.; AHMAD, N.; KHAN, M. A. Physico-chemical, phytochemical evaluation and dpph-scavenging antioxidant potential in medicinal plants used for herbal formulation in Pakistan. **World Journal of Agricultural Sciences**, Deira, v. 43, p. 63-67, Dec. 2011. Special issue.

FERNIE, A. R. The future of metabolic phytochemistry: larger numbers of metabolites, higher resolution, greater understanding. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 68, n. 22/24, p. 2861-2880, Nov./Dec. 2007.

FERREIRA, D. **SISVAR - Sistema de Análise de Variância**. Lavras: UFLA/DEX, 1999.

FERRER, J. L. et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 46, n. 3, p. 356-370, 2008.

FLORAO, A. et al. Essential oils from *Bacharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 24, n. 6, p. 561-570, 2012.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 3, n. 7, p. 408-414, 2007.

GHANATI, F.; BAKHTIARIAN, S. Changes of natural compounds of *Artemisia annua* L. by methyl jasmonate and silver nanoparticles. **Advances in Environmental Biology**, Amman, v. 7, n. 9, p. 2251-2258, 2013.

GHANATI, F. et al. Production of new active phytochemicals by *Achillea millefolium* L. after Elicitation with Silver Nanoparticles and Methyl Jasmonate. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, Bhopal, v. 11, n. 2, p. 391-399, Aug. 2014.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

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

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOZZO, F.; FAORO, F. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 51, p. 12473-12491, Dec. 2013.

GREGIO, S. J. D.; MOSCHETA, I. S. Anatomia de raiz, caule e folha e identificação de estruturas secretoras de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 327-334, 2006.

HANN, C. T. et al. Methanol and ethanol modulate responses to danger-and microbe-associated molecular patterns. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 1-15, Oct. 2014.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

HERNANDEZ-CERUELOS, A.; MADRIGAL-BUJAIIDAR, E.; DE LA CRUZ, C. Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 135, n. 1/2, p. 103-110, Sept. 2002.

IRITI, M. et al. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 66, n. 3, p. 493-500, Sept. 2009.

IRITI, M. et al. Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean. **Biological Control**, Orlando, v. 54, n. 4, p. 241-247, Feb. 2010.

KAKU, H. et al. Plant cells recognize chitin fragments for defence signalling through a plasma membrane receptor. **Proceedings of the National Academic of Science of USA**, Washington, v. 103, n. 29, p. 11086-11091, July 2006.

KANT, M. R. et al. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 1, p. 483-495, May 2004.

KEELING, C. I. et al. Functional plasticity of paralogous diterpene synthases involved in conifer defense. **Proceedings of the National Academic of Science of USA**, Washington, v. 105, n. 3, p. 1085-1090, Jan. 2008.

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

KINDLOVITS, S.; NÉMETH, E. Sources of variability of yarrow (*Achillea* SPP.) essential oil. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 41, p. 92-103, Sept. 2012. Supplement 1.

KJAER, A.; GREVSEN, K.; JENSEN, M. Effect of external stress on density and size of glandular trichomes in full-grown *Artemisia annua*, the source of anti-malarial artemisinin. **AOB Plants**, Oxford, v. 18, p. 1-12, June 2012.

KLIEBENSTEIN, D. Secondary metabolites and plant environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 675-684, 2004.

KOBAYASHI, H.; YANAKA, M.; IKEDA, T. M. Exogenous Methyl Jasmonate Alters Trichome Density on Leaf Surfaces of Rhodes Grass (*Chloris gayana* Kunth). **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 29, n. 4, p. 506-511, Dec. 2010.

KOERS, S. et al. Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels. **The Plant Journal**, Oxford, v. 68, n. 4, p. 670-680, Nov. 2011.

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

KOTAN, R. et al. Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 1, p. 145-160, 2010.

LANGE, B. M. The evolution of plant secretory structures and emergence of terpenoid chemical diversity. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 66, p. 139-159, 2015.

LEHMANN, S. et al. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 112, p. 54-62, Apr. 2015.

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

LIM, F. L. et al. Elicitation of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture for enhancement of phenolic compounds biosynthesis and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, London, v. 50, p. 436-442, Oct. 2013.

LIMA, J. L. S. D. et al. **Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil**. Campina Grande: CEDAC, 2006. 82 p.

LUDWIG, N. et al. Reduction of evaporative flux in bean leaves due to chitosan treatment assessed by infrared thermography. **Infrared Physics & Technology**, Exeter, v. 53, n. 1, p. 65-70, Jan. 2010.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 129-438, 2002.

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

MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M. Variação química do óleo essencial de *Hyptis Suaveolens* (L.) POIT., sob condições de cultivo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1203-1209, 2006.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MIYAZAWA, S. I.; LIVINGSTON, N. J.; TURPIN, D. H. Stomatal development in new leaves is related to the stomatal conductance of mature leaves in poplar (*Populus trichocarpa* X *P. deltoides*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 373-380, 2006.

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

MOOKDASANIT, J. et al. Trace volatile components in essential oil of *Citrus sudachi* by means of modified solvent extraction method. **Food Science and Technology Research**, Wageningen, v. 9, n. 1, p. 54-61, 2003.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NADIM, M. M. et al. The essential oil composition of *Achillea millefolium* L. cultivated under tropical condition in India. **World Journal of Agricultural Sciences**, Deira, v. 7, n. 5, p. 561-565, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. **Topic detection and tracking evaluation**. 2008. Disponível em: <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em: 8 out. 2015.

NOEL, J. P.; AUSTIN, M. B.; BOMATI, E. K. Structure–function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 249-253, 2005.

NOGUEIRA, M. A.; MINETTO, A. Controle de qualidade de chás de camomila (*Matricária recutita* L.) comercializados na cidade de Cascavel e regiões. **Revista Varia Scientia**, Cascavel, v. 4, n. 8, p. 113-120, 2005.

ÓLEOS essenciais RG. 2009. Disponível em:  
<<http://www.oleosessenciais.org/>>. Acesso em: 21 nov. 2015.

PERES, R. et al. *Achillea millefollium* - asteraceae: estudo fitoquímico, espectrofotométrico e da atividade antifúngica (*Colletotrichum musae*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 6, n. 3, p. 81-93, 2009.

PETERSEN, M. Current status of metabolic phytochemistry. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 68, n. 22/24, p. 2847-2860, 2007.

PINTO, J. E. B. P. et al. Produção de biomassa e óleo essencial em mil folhas cultivada sob telas coloridas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 321-326, Sept. 2014.

PINTO, J. E. B. P.; SANTIAGO, E. J. A. D.; LAMEIRA, O. A. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras: UFLA, 2000. 208 p.

PRESIBELLA, M. M. et al. Comparison of chemical constituents of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert essential oil and its anti-chemotactic activity. **Brazil Archives Biological Technology**, Curitiba, v. 49, n. 5, p. 717-724, Sept. 2006.

QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 50, n. 3, p. 586-621, Jan. 2011.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.

RODRIGUES, V. G. S. **Cultivo, uso e manipulação de plantas medicinais**. Brasília: EMBRAPA, 2004. v. 1, 25 p.

ROELFSEMA, M. R.; HEDRICH, R. In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. **New Phytologist**, Cambridge, v. 167, n. 3, p. 665-691, Sept. 2005.

ROJO, E.; SOLANO, R.; SANCHEZ-SERRANO, J. J. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 22, n. 1, p. 82-98, Mar. 2003.

ROSA, M. B. et al. Estudo espectrofotométrico da atividade foto-protetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. Capitata, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (jacq.). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 5, n. 1, p. 101-110, 2008.

SALVAGNINI, L. E. et al. Evaluation of efficacy of preservatives associated with *Achillea millefolium* L. extract against *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 75-77, 2006.

SANTOS, M. R. A. et al. Composição química e atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 757-762, 2013.

SANTOS, T. G. et al. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper Malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

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

SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 54, n. 6, p. 817-826, 2013.

SINGH, O. et al. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. **Pharmacognosy Reviews**, Bangalore, v. 5, n. 9, p. 82-95, 2011.

SPIN-NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.

TABANCA, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4300-4303, Sept. 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

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

THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN Biochemistry**, Cairo, v. 2013, p. 1-10, 2013.

THALER, J. S. et al. Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, p. 1597-1609, 1999.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 297-304, June 2006.

THOMPSON, A. J. et al. Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, n. 6, p. 833-845, Apr. 2000.

TRAW, M. B.; BERGELSON, J. Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 1367-1375, Nov. 2003.

TRAW, M. B.; DAWSON, T. E. Differential induction of trichomes by three herbivores of black mustard. **Oecologia**, Berlin, v. 131, n. 4, p. 526-532, May 2002.

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

VANDENDOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed Gas-Liquid Partition

Chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-471, 1963.

VERMA, M. et al. Induction of mitochondrial-dependent apoptosis by an essential oil from *Tanacetum gracile*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 74, n. 5, p. 515-520, 2008.

WANG, J. et al. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. **Bioresources and Bioprocessing**, London, v. 2, n. 5, p. 1-9, Dec. 2015.

WANG, M. et al. Effects of chitosan oligosaccharides on the yield components and production quality of different wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) in Northwest China. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 172, p. 11-20, Feb. 2015.

WANICHPONGPAN, P.; SURIYACHAN, K.; CHANDRKRACHANG, S. Effect of chitosan on the growth of *Gerbera* flower plant (*Gerbera jamesonii*). **Chitin and chitosan: Chitin and Chitosan in Life Science**, Yamaguchi, p. 198-201, 2001.

WEISSHAAR, B.; JENKINS, G. I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 251-257, 1998.

YAMAGUCHI, Y.; HUFFAKER, A. Endogenous peptide elicitors in higher plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 351-357, Aug. 2011.

YIN, H. et al. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 1, p. 136-143, Jan. 2012.

ZAKER, A. et al. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. **Industrial Crops and Products**, London, v. 67, p. 97-102, May 2015.

ZHAO, J. L.; ZHOU, L. G.; WU, J. Y. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 1, p. 137-144, June 2010.