



JOYCE PEREIRA ALVARENGA

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
FITOQUÍMICAS DE *Ocimum gratissimum* APÓS A
ELICITAÇÃO**

**LAVRAS - MG
2018**

JOYCE PEREIRA ALVARENGA

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E FITOQUÍMICAS DE *Ocimum gratissimum* APÓS A ELICITAÇÃO

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

Orientador
Dr. Amauri Alves de Alvarenga

**LAVRAS - MG
2018**

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

Alvarenga, Joyce Pereira.

Respostas fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas de *Ocimum
gratissimum* após a elicitação / Joyce Pereira Alvarenga. - 2018.
47 p. : il.

Orientador(a): Amauri Alves de Alvarenga.

.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. ácido salicílico. 2. óleo essencial. 3. sinalização. I.
Alvarenga, Amauri Alves. . II. Título.

JOYCE PEREIRA ALVARENGA

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E FITOQUÍMICAS DE *Ocimum gratissimum* APÓS A ELICITAÇÃO

PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND PHYTOCHEMICAL RESPONSES OF *Ocimum gratissimum* AFTER ELICITATION

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

APROVADA em 28 fevereiro de 2018.
Dr. Amauri Alves de Alvarenga UFLA
Dra. Ana Hortência Fonseca Castro UFSJ
Dra. Kamila Rezende Dázio de Souza UNIFAL

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga
Orientador

**LAVRAS - MG
2018**

Aos meu pais, que sempre acreditaram em mim, dedicam a vida para minha educação e formação pessoal, principalmente. Obrigada pela torcida!

OFEREÇO

Ao Professor Dr. Amauri Alves de Alvarenga, uma de suas últimas orientações e aos amigos da Fisiologia que ajudaram para a construção desta dissertação.

DEDICO

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelo amor incondicional, pelas graças recebidas durante todo este percurso e pelas pessoas especiais que conheci.

Agradeço a minha Família; Pai, Mãe e Irmão por sempre acreditarem em mim. Por terem ensinado-me a ser quem sou. Se consegui chegar onde cheguei, devo todo o sucesso a vocês. Agradeço a meu noivo Alyson por estar comigo desde o início, tendo paciência, amando-me e incentivando-me a buscar sempre o melhor.

Agradeço ao Professor Amauri Alves de Alvarenga, pela oportunidade de ser sua orientada. Pelos ensinamentos, pelas conversas, pela amizade e principalmente por ser essa pessoa maravilhosa que nos trata com muito carinho.

Agradeço aos amigos de laboratório, Raphael, Roniel, Lorena, Paulo e João Paulo, por serem grandes amigos e estarem sempre dispostos a ajudar. Em especial agradeço aos mais presentes Raphael, Paulo e João Paulo por toda amizade e suporte ao longo deste tempo. Principalmente pelas conversas e risadas.

Agradeço a todos as amigas e aos amigos do Departamento de Fisiologia Vegetal, que de certa forma auxiliaram na jornada. Foram 2 anos maravilhosos e de muito crescimento. Agradeço em especial aqueles que auxiliaram-me a conduzir os trabalhos.

Agradeço a todos os Professores da Fisiologia pelos ensinamentos e oportunidade de crescimento. Em especial ao Professor Luiz Edson Mota de Oliveira pela amizade, por todas as aulas e ensinamentos.

Agradeço aos técnicos e funcionários da UFLA em especial, Salete, Joel, Odorêncio e Tanham, não somente pela ajuda física e burocrática, mas também pela amizade.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade concedida para realizar este Mestrado em Fisiologia Vegetal. Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

A espécie *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) é vastamente conhecida em várias regiões do mundo, devido as suas propriedades condimentares, culinárias e medicinais. Além disto, o óleo essencial desta espécie possui atividade antifúngica e antioxidante, permitindo sua aplicação comercial. Entretanto, há um contratempo na produção destes óleos essenciais, sua síntese ocorre com um baixo rendimento. Por este motivo, estudos tem utilizado elicitores para contornar este entrave. Os elicitores são compostos naturais ou sintéticos que atuam mimetizando efeitos de estresse nas plantas, promovendo portanto a elicitação de respostas de defesa nas mesmas. O fitohormônio ácido salicílico, o qual já está relacionado ao processo de resistência sistêmica nas plantas, tem sido utilizado como um elicitor para otimizar a produção de metabólitos secundários. Um outro problema relacionado aos óleos essenciais, é a variabilidade existente no rendimento e qualidade que ocorre quando estes são extraídos de folhas frescas ou secas. Portanto, objetivou-se utilizar o ácido salicílico para otimizar a produção do óleo essencial de *O. gratissimum*, caracterizar as respostas fisiológicas e bioquímicas envolvidas no processo de elicitação; bem como caracterizar também os óleos essenciais extraídos de folhas frescas e secas. As plantas foram divididas em duas condições, plantas controle (com aplicação de água) e plantas tratadas (com aplicação de 1mM de ácido salicílico). As extrações dos óleos essenciais, de folhas frescas e secas, foram realizadas 10 dias após a elicitação. Foram realizadas também avaliações fisiológicas e bioquímicas, no prazo de 10 dias após aplicação do elicitor. Como esperado, a elicitação das plantas com ácido salicílico promoveu um aumento no teor do óleo essencial de *O. gratissimum*. Os maiores teores observados foram para as amostras de folhas frescas. Foi observado um teor de 89,42% em folhas frescas e de 75,72% em folhas secas do composto majoritário eugenol. Além disto, de acordo com os resultados mencionados, foi observado um aumento na sinalização de respostas de defesa nas plantas elicitadas, como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da Fenilalanina Amônia Liase, e no teor de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica. Para as variáveis de crescimento não foram observadas diferenças entre as condições. Enquanto para a quantificação de micro e macromoléculas as plantas tratadas apresentaram um menor conteúdo em proteína do que as plantas controle. A elicitação com ácido salicílico, portanto, otimizou a produção de óleo essencial em *O. gratissimum*, mediante influencia no processo de sinalização de defesa nas plantas. Ademais, um maior teor do óleo essencial e do composto majoritário eugenol foi obtido a partir da extração utilizando folhas frescas.

Palavras-chave: Alfavaca, eugenol, ácido salicílico, metabolismo secundário, sinalização, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

The species *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) is widely known in several regions of the world, due to its condiment, culinary and medicinal properties. In addition, the essential oil of this species has antifungal and antioxidant activity, allowing its commercial application. However, there is an issue with the production of these essential oils, their synthesis occurs with a low yield. For this reason, studies have used elicitors to solve this obstacle. The elicitors are natural or synthetic compounds that act mimicking the effects of stress on plants, thus promoting the elicitation of defense responses. The phytohormone salicylic acid, which is already related to the process of systemic resistance in plants, has been used as an elicitor to optimize the production of secondary metabolites. Another problem related to essential oils, it is the variability that occurs in yield and in the quality of the oils when they are extracted from fresh or dried leaves. Therefore, it was proposed to use salicylic acid to optimize *O. gratissimum* essential oil production, to characterize physiological and biochemical responses involved in this process; as well as characterize the essential oils extracted from fresh and dry leaves. The plants were divided into two conditions, control plants (with water spray) and treated plants (spraying 1mM of salicylic acid). Extractions of essential oils from fresh and dried leaves were carried out 10 days after elicitation. It was also performed physiological and biochemical analysis within 10 days after the application of the elicitor. As expected, the elicitation of plants with salicylic acid promoted an increase in the yield of *O. gratissimum* essential oil. The highest yield was observed for fresh leaves. It was observed a content of 89.42% in fresh leaves and 75.72% in dry leaves of the major compound eugenol. In addition, an increase in the signaling defense responses was observed in elicited plants, such as the increase of antioxidant enzymes and Phenylalanine Ammonia Liase, and the content of hydrogen peroxide and lipid peroxidation. For growth variables were not observed differences between the conditions. For the quantification of micro and macromolecules treated plants showed lower protein content than control plants. It was concluded that the elicitation with salicylic acid optimized the production of essential oils in *O. gratissimum*, due to the process of defense signaling in plants. In addition, a higher yield of essential oil and the major compound, eugenol, was obtained from fresh leaf extraction.

Keywords: Alfavaca, eugenol, salicylic acid, secondary metabolism, signalization, antioxidant enzymes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Caracterização da espécie	11
2.2	Metabolismo secundário e óleo essencial	13
2.3	Óleo essencial de <i>O. gratissimum</i>	14
2.4	Elicitação	15
2.5	Ácido salicílico	16
3	METODOLOGIA.....	18
3.1	Obtenção das plantas de <i>O. gratissimum</i>	18
3.2	Condições experimentais.....	18
3.3	Elicitação	19
3.4	Extração e análise química do óleo essencial.....	19
3.5	Caracterização do crescimento	21
3.6	Quantificação de macro e micromoléculas	21
3.7	Análises do sistema antioxidante	22
3.7.1	Atividade da Dismutase do Superóxido (SOD)	23
3.7.2	Catalase (CAT).....	23
3.7.3	Teor de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	23
3.7.4	Peroxidação lipídica	24
3.7.5	Fenilalanina amônia-liase (PAL)	24
3.8	Análise estatística	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1	Teor dos óleos essenciais	25
4.1.1	Influência do ácido salicílico	25
4.1.2	Influência do tipo de material vegetal	26
4.2	Qualidade dos óleos essenciais	27
4.2.1	Influência do ácido salicílico	27
4.2.2	Influência do tipo de material vegetal.....	29
4.3	Caracterização do crescimento	30
4.4	Moléculas do metabolismo primário	31
4.5	Análises do sistema antioxidante	32
5	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

Ao longo de gerações e no mundo todo, faz-se uso do conhecimento popular sobre as plantas medicinais para o tratamento de várias enfermidades, seja como chás ou até mesmo em rituais religiosos. No entanto, ressalta-se que há algum tempo as plantas medicinais vêm rompendo fronteiras e adquirindo espaço na agricultura e no comércio, principalmente, tendo em vista o aumento significativo da demanda e a conscientização da população pela frequente procura por alimentos e medicamentos naturais (BIZZO et al 2009; JUNIOR; PINTO e MACIEL, 2005).

A partir das plantas medicinais são extraídos os óleos essenciais, que são produto do metabolismo secundário. O emprego mais clássico e conhecido dos óleos essenciais é nas indústrias de cosméticos, perfumaria e como aroma para alimentos. No entanto, estes podem ainda ser utilizados como medicamentos em aromaterapia, como conservantes alimentícios, repelentes dentre outros (BIZZO et al., 2009; BRITO et al., 2013). Estes óleos essenciais são sintetizados muitas vezes pelas plantas para se protegerem contra algum tipo de estresse ou para atração de polinizadores, entretanto, são produzidos em pequenas quantidades (KIM et al., 2006). Desta forma uma maneira de aumentar sua produção, uma vez que existe a demanda por este produto, seria intensificar e induzir as vias de biossíntese dos metabólitos secundários. Para compreender as vias de síntese das mais variadas moléculas bioativas, bem como os fatores determinantes nos processos de síntese, abordagens biotecnológicas, como aplicação de produtos tem sido estudadas (AHMAD et al., 2013; GANDHI; MAHAJAN e BEDI, 2014).

Para tanto, pesquisas tem utilizado produtos naturais ou sintéticos, denominados elicitores, com o intuito de intensificar a síntese de metabólitos secundários em plantas medicinais. Estes compostos atuam como sinalizadores em baixas concentrações quando aplicados nas plantas (AHMAD et al., 2013; LEE;PARK e PAEK, 2015; MANIVANNAN et al., 2016). Os elicitores simulam o mecanismo de percepção e sinalização que ocorre durante a invasão do patógeno, resultando na expressão diferencial de genes relacionados à defesa (AHMAD et al., 2013; KOLAREVIC et al., 2015). Entretanto, a ação destes compostos irá depender de fatores como o tipo de elicitador utilizado, as concentrações aplicadas, o tempo de exposição ao elicitador, bem como a forma de aplicação e outros parâmetros que possibilitem a indução do metabolismo sem que haja, contudo, problemas celulares indesejáveis envolvidos (DOUSSEAU et al., 2016).

O ácido salicílico (AS) é um exemplo de elicitor. Naturalmente está presente nas plantas como um fitohormônio. Do ponto de vista químico, o AS é um composto fenólico sintetizado na rota do ácido chiquímico. Como fitohormônio está envolvido em respostas de crescimento e desenvolvimento, mas além disto participa em processos de sinalização de resposta sistêmica a situações de estresses bióticos e abióticos. Influenciando portanto, na ativação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como os compostos fenólicos por exemplo (GONDOR et al., 2016; KANG, LI e GUO, 2014; KHAN et al., 2015; VLOT, DEMPSEY e KLESSING, 2009). Estudos realizados com AS como elicitor, tem demonstrado que é possível aumentar a síntese destes compostos secundários a partir da elicitação das plantas (GHARIB, 2006; GONDOR et al., 2016; KOLAREVIC et al., 2015).

O gênero *Ocimum* (Lamiaceae) possui várias espécies com propriedades medicinais, aromáticas e condimentares conhecidas mundialmente. A espécie *Ocimum gratissimum* L. conhecida popularmente como alfavaca, é utilizada no tratamento de diarreia, gripe, reumatismo e paralisia, ainda possui ação expectorante e carminativa. As propriedades do seu óleo essencial estendem-se às atividades antifúngicas, anti-aflatoxigênicas e antioxidantes (DAMBOLENA et al., 2010; PRAKASH et al., 2011). Para *O. gratissimum* são conhecidos alguns quimiotipos de acordo com a composição química majoritária de seu óleo essencial, estes são: quimiotipo eugenol, timol, citral, linalol e cinamato de etil (NGUEMTCHOUIN et al., 2013). No Brasil, a espécie *O. gratissimum* L. está presente na lista de espécies vegetais com potencial para gerar produtos de interesse ao SUS (Sistema Único de Saúde) (RENISUS), o que justifica e incentiva mais uma vez investimentos em pesquisas com a espécie (BRASIL, 2015).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influencia do elicitor ácido salicílico, na produção e qualidade do óleo essencial da espécie *O. gratissimum*, extraídos de folhas frescas e secas, bem como caracterizar respostas fisiológicas e bioquímicas causadas pela elicitação nas plantas.

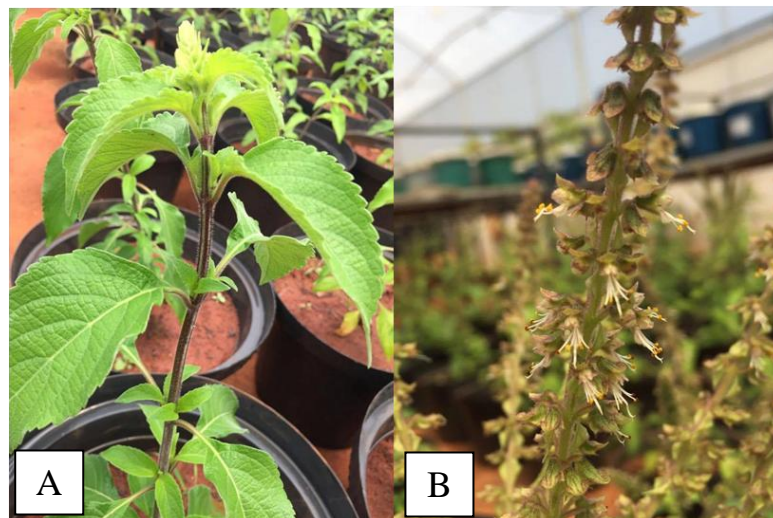
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie

O gênero *Ocimum*, pertencente à família Lamiaceae, apresenta várias espécies com propriedades medicinais, aromáticas e condimentares conhecidas mundialmente (LORENZI & MATOS, 2008). A espécie *Ocimum gratissimum* L. tem como berço de origem a África,

mas também é encontrada ao longo da América, Ásia e Índia (EGESIE et al., 2006; VIEIRA et al., 2001). Esta espécie é conhecida como alfavaca ou alfavaca-cravo. É um subarbusto aromático, ereto, com até um metro de altura. Suas folhas são ovalado-lanceoladas, com bordos duplamente dentados, membráceas, de 4-8 cm de comprimento (FIGURA 1). Apresenta inflorescências brancas, dispostas em racemos paniculados eretos e, geralmente, em grupos de três. Possui frutos do tipo cápsula, pequenos, possuindo quatro sementes esféricas (LORENZI & MATOS, 2008).

Figura 1 - Fotos da espécie *Ocimum gratissimum* L. Aspecto geral (A) e detalhe da inflorescência (B).



Fonte: Do autor (2016)

Na medicina tradicional, as folhas desta planta são utilizadas na preparação de chás com propriedades antigripais, no tratamento de diarreia, reumatismo, paralisia, doenças mentais, ainda possui ação expectorante, carminativa, (DAMBOLENA et al., 2010; PRABHU et al., 2009; PRAKASH et al., 2011) possuem efeitos hiperglicêmicos (EGESIE et al., 2006) e várias outras peculiaridades (PRABHU et al., 2009). Além disto, o óleo essencial desta espécie apresenta ainda atividades antifúngicas, anti-aflatoxigênicas e bioinseticidas, o qual pode ser utilizado para o tratamento de produtos a fim de serem armazenados (NGUEMTOUIN et al., 2013). Estas atividades do óleo essencial são em grande parte atribuídas ao composto majoritário eugenol. Todavia, a relação sinérgica entre os outros compostos pode existir e ser elementar em alguns casos, mesmo quando presente em baixas concentrações (OLIVEIRA et al., 2016).

As propriedades descritas para a espécie estão de maneira geral associadas a utilização de extratos da parte aérea. No entanto, *O. gratissimum* possui ainda uma notável atividade antioxidante que está presente na planta como um todo, seja em seu chá, extratos, óleo essencial ou pelo isolamento de um de seus compostos ativos responsáveis por esta característica, o eugenol (MAHAPATRA e ROY, 2014).

Diante do exposto, é possível compreender o quão considerável são as propriedades relacionadas a esta espécie. Por isso, no Brasil, o *O. gratissimum* está presente na lista de espécies vegetais com potencial para gerar produtos de interesse ao SUS (RENISUS), justificando, portanto, a escolha da espécie para investimentos em pesquisas (BRASIL, 2015).

2.2 Metabolismo secundário e óleo essencial

Os óleos essenciais, produtos do metabolismo secundário, são constituídos basicamente por compostos voláteis pertencentes à classe dos terpenos (mono e sesquiterpenos) e dos fenilpropanóides (KANG et al., 2015).

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 ácido mevalônico. Esse intermediário segue por várias reações (pirofosforilação, descarboxilação, desidratação) para então produzir o isopentenil difosfato (IPP), precursor inicial para a síntese dos demais terpenos. A segunda rota, conhecida como rota do metileritritol fosfato (MEP) ocorre em cloroplastos e demais plastídios. Nesta via, o piruvato derivado da glicólise e o gliceraldeído-3-fosfato proveniente do ciclo de Calvin unem-se para formar um intermediário que rapidamente é convertido em IPP. A partir do IPP, os demais compostos terpênicos são sintetizados (BARROS, ZAMBARDA e HEINZMANN, 2009; KANG et al., 2015).

O grupo dos fenilpropanóides é sintetizado a partir da via do chiquimato por meio dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, o último com menor participação (SANGWAN et al., 2001; VOGT, 2010). Em condições normais, parte do carbono fixado no metabolismo primário, 20%, passa por meio desta via de metabolismo secundário. As enzimas fenilalanina amônia liase (PAL) e tirosina amônia liase (TAL) fazem parte de reações importantes na formação de fenilpropanóides, sendo largamente estudadas (VOGT, 2010). A PAL realiza a conversão de fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico, por meio da desaminação da L-fenilalanina. Esta enzima é regulada por fatores ambientais e bióticos. Diferentes compostos fenólicos, presentes na síntese de ligninas, flavonóides, cumarinas e ésteres,

podem ser formados a partir do ácido *trans*-cinâmico após sua ativação. Um outro produto advindo desta via é o ácido salicílico, sendo o ácido *trans*-cinâmico convertido a ácido benzóico e logo em ácido salicílico (STANGARLIN et al., 2011).

Os fenilpropanóides são considerados como agentes voláteis e agem como toxinas para insetos e micróbios, mas também como agentes polinizadores e para humanos, considerados potentes analgésicos. Estes compostos são produzidos e estocados em tecidos vegetativos para fins de defesa contra herbivoria e parasitismo por meio de fungos e bactérias. Mas são também encontrados nos tecidos reprodutivos, como tecidos florais, para a emissão volátil de compostos responsáveis pela atração de polinizadores (KOEDUKA et al., 2006).

Os óleos essenciais são produzidos nas plantas, geralmente, em pequenas quantidades, sendo portanto, inviável a extração dos mesmos a partir de plantas em condições normais de cultivo. Logo, vários autores tem realizado trabalhos com o intuito de aumentar a síntese e produção destes compostos, para que assim, estes possam ser utilizados para atender a demanda de produtos farmacêuticos, cosméticos e para diversas indústrias (AHMAD et al., 2013; LEE, PARK e PAEK, 2015; MANIVANNAN et al., 2016).

2.3 Óleo essencial de *O. gratissimum*

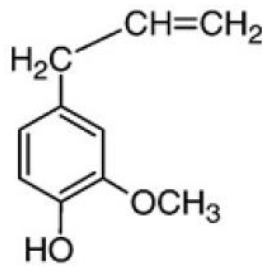
Para *O. gratissimum* são conhecidos alguns quimiotipos de acordo com a composição majoritária de seu óleo essencial, estes são: quimiotipo eugenol, timol, citral, linalol, geraniol e cinamato de etil. Entretanto, ainda existem variações intra-específicas quanto a composição química majoritária dos óleos essenciais, devido as condições de cultivo, geográficas, ambientais e meios de extração (NGUEMTCHOUIN et al., 2013; PRAKASH et al., 2011; VIEIRA et al., 2001).

Portanto, os trabalhos desenvolvidos a partir da caracterização dos óleos essenciais de *O. gratissimum*, demonstram haver sempre estas diferenças em sua composição. Dambolena et al. (2010), encontraram os compostos eugenol, α -humuleno, *z*- β -ocimeno, linalol e cânfora, dentre outros em menor porcentagem nas amostras de óleos essenciais extraídos de *O. gratissimum*. Prakash et al. (2011), encontraram como componentes majoritários os seguintes compostos: metil cinamato, γ -terpineno e 1,8-cineol. Enquanto, Santana et al. (2014), encontraram os compostos: (*Z*)- β -ocimeno, eugenol, germacreno D, (*E*)- β -cariofileno, dentre outros em menor porcentagem.

Dentre os compostos majoritários, o eugenol (FIGURA 2), tendo o isoeugenol como sua isoforma, possui uma gama de propriedades farmacológicas tais como, anestésica,

antimicrobiana, antioxidante, anti-repelente, anti-carcinogênica e anti-inflamatória. Além de usos em cosméticos, perfumarias e como agentes aromatizantes. Ademais, o emprego deste composto é considerável seguro, por ser sintetizado naturalmente pelas plantas, sendo não carcinogênico e não mutagênico (RAJA et al., 2015).

Figura 2 - Estrutura química de Eugenol.



Fonte: Raja et al. (2015).

2.4 Elicitação

Os produtos do metabolismo secundário das plantas, como os óleos essenciais, são de grande interesse para indústrias de diversas áreas, como já mencionado. Entretanto, por fins ecológicos estes são produzidos em pequenas quantidades, sendo este portanto, um problema para a produção em larga escala de compostos secundários. Para tanto, compostos químicos, denominados como elicitores tem sido utilizados na tentativa de aumentar a produção de tais compostos secundários nas plantas. Os elicitores induzem respostas de defesa semelhantes às causadas durante uma infecção patogênica, por exemplo (ESTRADA et al., 2016; ZHAO, DAVIS e VERPOORT, 2005). Os elicitores são compostos químicos sintéticos ou naturais que atuam como sinalizadores em baixas concentrações. Esses compostos simulam o mecanismo de percepção e sinalização que ocorre durante a interação planta-patógeno, resultando na expressão diferencial de genes relacionados à defesa sistêmica adquirida (AHMAD et al., 2013; DOUSSEAU et al., 2016; KOLAREVIC et al., 2015).

O reconhecimento dos elicitores e/ou de patógenos pelas plantas, inicia-se por meio da ligação dos mesmos a receptores localizados na membrana da célula atingida. Esta ligação ativa enzimas, como a NADPH-oxidase, localizadas na membrana da célula vegetal que irão catalisar reações de redução do O₂ molecular. O ponto inicial da rota de transdução de sinal é a explosão oxidativa que ocorre envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio

(EROs), formadas inicialmente pela redução do oxigênio molecular. Tais compostos incluem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (HANN et al., 2014; LEHMANN et al., 2015). Após a explosão oxidativa várias respostas podem vir a ser acionadas, tais como, influência direta sobre o patógeno (quando for o caso); fortalecimento das paredes celulares com ajuda das proteínas estruturais; fortalecimento das membranas por meio da peroxidação lipídica e perda de sua fluidez; e a regulação da expressão de genes e fatores de transcrição relacionados a respostas de resistência (STANGARLIN et al., 2011). Já uma segunda linha de resposta envolve a abertura dos canais de cálcio e o seu influxo transitório. 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 Ca^{2+} , óxido nítrico e H_2O_2 são componentes da rota de sinalização que ativam a cascata de MAMPs cinases (padrões moleculares associados a patógenos), alterando a expressão de genes relacionados a síntese de enzimas hidrolíticas e enzimas que participam do processo de formação de fitoalexinas, lignina e compostos secundários importantes no mecanismo de defesa da planta como: flavonóides, taninos, terpenos, alcalóides, dentre outros (AGURLA e RAGHAVENDRA, 2016; LEHMANN et al., 2015).

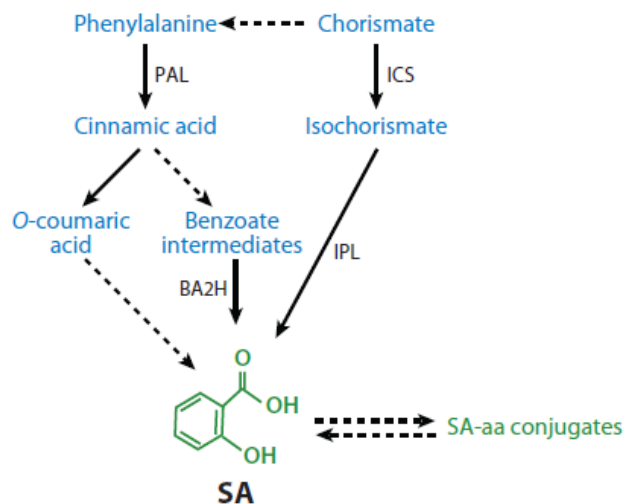
Vários estudos já demonstraram a eficiência de elicitores na produção de metabólitos secundários. Até mesmo protocolos para produção em escala comercial de componentes bioativos para indústrias já são demonstrados (AHMAD et al., 2013; LEE, PARK e PAEK, 2015; MANIVANNAN et al., 2016). Apesar da comprovada eficácia dos elicitores, novos trabalhos neste contexto necessitam ser desenvolvidos visando a determinação de alguns parâmetros como: tipo de elicitador utilizado, sua resposta para cada espécie, as concentrações aplicadas, o estágio de desenvolvimento da planta, tempo de exposição ao eliciador, sua forma de aplicação, dentre outros parâmetros que possibilitem a indução do metabolismo sem que haja, contudo, problemas celulares indesejáveis envolvidos (DOUSSEAU et al., 2016; PACHECO et al., 2016).

2.5 Ácido salicílico

O AS é um composto fenólico derivado do metabolismo dos vegetais, podendo ser sintetizado via corismato e/ou via fenilalanina (FIGURA 3). A enzima PAL converte o aminoácido fenilalanina em ácido cinâmico e seus derivados até AS; e a partir do corismato, a

enzima isocorismato sintase e isocorismato piruvato liase convertem, respectivamente, corismato a isocorismato, e este ao AS (VLOT et al., 2009). Presente naturalmente nas plantas como um fitohormônio, o AS controla funções vitais como floração, movimento estomático, absorção iônica, crescimento vegetal, dentre outros. Além destas funções, este fitohormônio participa das sinalizações químicas envolvidas na defesa contra patógenos, podendo também alterar a síntese e função de outros fitohormônios vegetais, e influenciar na produção de metabólitos secundários (KOLAREVIC et al., 2015). Durante a interação planta-patógeno poderá ocorrer um acúmulo de AS, o qual participa da indução da resistência sistêmica adquirida (RSA), no local da infecção, podendo este direcionar-se também para outras partes da planta sinalizando a resposta de defesa (RAHIMI et al., 2014; ZHAO et al., 2005).

Figura 3 - Representação esquemática da síntese de ácido salicílico (SA/AS) modificada.



Fonte: VLOT et al. (2009).

O AS já tem sido utilizado como elicitador para promover o aumento na produção e teor de produtos do metabolismo secundário. Kolarevic et al. (2015), encontraram um aumento na produção de ácido rosmarínico e ácido carnósico em *Salvia officinalis* L. após elicitação com AS. Gondor et al. (2016), confirmam o aumento na biossíntese de flavonóides após elicitação de plantas de trigo com AS. Nair et al. (2013), trabalhando com *Rauvolfia serpentina* tiveram um grande aumento nos compostos fenólicos após elicitação com AS.

Outros estudos avaliam a aplicação de AS em plantas que estejam passando por algum tipo de estresse como seca, salinidade, altas temperaturas e frio. Os resultados tem demonstrado que nestas condições o elicitador tem melhorado o desempenho das planta perante

estas situações (ANAYA et al., 2015; GHARIB e HEGAZI, 2010; GU et al., 2016). O AS age não somente diretamente na mitigação do estresse causado na planta, mas também influencia a produção de EROs para que seja iniciado o processo completo de sinalização para a produção de defensores (GONDOR et al., 2016).

Além disto, tem sido observado, que existe uma variação nos resultados obtidos nestes trabalhos de acordo com a dose de AS utilizada, o tempo de exposição e a espécie de planta utilizada (KHAN et al., 2016; RODRIGUES-BRANDÃO et al., 2014). Necessitando portanto de estudos neste sentido.

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção das plantas de *O. gratissimum*

As plantas matrizes utilizadas encontram-se no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, com excisata depositada no herbário da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), em Belo Horizonte, sob registro PAMG 57.857. As mudas de *O. gratissimum* foram provenientes de propagação assexuada por meio de estacas. Após enraizamento em bandejas de polipropileno expandido de 72 células, contendo substrato comercial Plantmax®, as mudas foram transplantadas com 50 dias para vasos plásticos, com capacidade de 6L. O substrato utilizado foi composto por subsolo, areia e compostagem orgânica, na proporção de 1:1:1. As características físico-químicas do solo foram analisadas pelo Laboratório de Análises de Solo do Departamento de Ciências do Solo da UFLA. Os valores encontrados foram os seguintes: pH:7,1; P: 5,36mg/dm³; K: 65,83mg/dm³; Ca: 3,53cmol/dm³; Mg: 0,93 cmol/dm³; Al: 0,06 cmol/dm³; H+Al: 1,00 cmol/dm³; V: 82,22%; MO: 2,47 dag/Kg. Sendo que, um enriquecimento com NPK por meio de solução nutritiva foi realizado ajustando os valores para: N:19,2mg/Kg; P: 36,36mg/Kg; K:78,59mg/Kg.

3.2 Condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, entre os meses de abril a julho de 2017. As condições ambientais foram monitoradas e as variáveis climáticas referentes à temperatura máxima, mínima e média (°C), umidade relativa (%) e insolação (h) encontram-se na Tabela 1. O

delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), sendo 2 condições; o controle (plantas pulverizadas com água destilada) e a concentração de 1mM do elicitor AS (concentração determinada conforme estudo prévio com dados não publicados); com 7 blocos (6 plantas em cada bloco) com um total de 84 parcelas.

Para avaliação do óleo essencial foram utilizadas 7 plantas de cada condição (amostra composta). Para avaliações de crescimento e quantificação de biomoléculas foram utilizadas 4 plantas para cada condição. Enquanto que, para avaliação do sistema antioxidante e enzimas foram contabilizados como tratamentos as duas condições (controle e AS) nos 4 tempos de avaliação; resultando portanto em 8 tratamentos com 5 repetições.

Tabela 1 - Variáveis meteorológicas registradas no período de abril à maio de 2017 na UFLA/Lavras – MG. Médias de temperatura máxima (TMAX), mínima (TMIN) e média (TMED) em °C, umidade relativa (UR) (%) e insolação (INSOL) (h).

	TMAX (°C)	TMIN (°C)	TMED (°C)	UR (%)	INSOL (h)
abr/17	27,61	16,77	21,17	74,26	7,10
mai/17	25,09	14,87	18,91	77,87	6,10
jun/17	24,82	12,73	17,64	74,80	8,00
jul/17	23,13	10,92	16,24	66,27	7,9

Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)

3.3 Elicitação

As mudas passaram por um período de aclimação (50 dias) após serem transplantadas para os vasos. Após 48 dias estas foram submetidas a aplicação foliar do elicitor. Para o presente trabalho foi determinada a concentração de 1mM de AS. A solução de AS foi aplicada nas plantas até o ponto de gotejamento (20mL), e as plantas controle receberam água destilada (20mL). Para evitar uma possível deriva e feito do AS entre as plantas, no momento da aplicação, cada tratamento foi protegido e por meio de placas de papelão.

3.4 Extração e análise química do óleo essencial

As extrações de óleo essencial foram realizadas no final do experimento, 10 dias após a aplicação do elicitor. Neste período as plantas estavam com 108 dias. Foram realizadas duas extrações, uma com folhas frescas e outra com folhas secas. Sendo que as amostras secas

passaram por um processo de desidratação em estufa de circulação forçada à 40 °C. Para cada extração foram utilizadas amostras compostas, foi selecionada uma planta por bloco, totalizando 7 plantas intactas para cada tratamento. As folhas foram coletadas e pesadas (± 35 g folhas frescas e 20g folhas secas) para extração do óleo essencial através do processo de hidrodestilação. O material vegetal juntamente com água destilada foram colocados em balão de vidro acoplado a um aparato de Clevenger, durante 90 minutos, obtendo-se um hidrolato. O óleo essencial obtido foi separado da água por centrifugação, e coletado com o auxílio de capilares de vidro. O material foi acondicionado em frascos de vidro âmbar, envoltos com papel-alumínio e armazenados sob refrigeração. Para as amostras frescas a determinação da umidade do material vegetal foi realizada utilizando o sistema de Dean e Stark, que baseia-se no princípio da imiscibilidade de solventes, no caso ciclohexano e água. Foram colocados em um balão de vidro 5g de material vegetal picado, juntamente com 80 mL de ciclohexano. Após 2 horas, o volume de água presente no material vegetal foi quantificado. A determinação da umidade foi realizada seguindo a metodologia descrita por Pimentel et al. (2006).

O rendimento da extração do óleo essencial de folhas frescas foi determinado em porcentagem de peso/peso (%p/p) em Base Livre de Umidade (BLU), utilizando a equação 1, enquanto o rendimento da extração do óleo essencial de folhas secas foi determinado pela equação 2.

EQUAÇÃO 1 - O rendimento do óleo essencial de folhas frescas foi obtido através da seguinte equação: onde, R(%) corresponde ao rendimento do óleo essencial (base livre de umidade); PO é o peso do óleo obtido após a hidrodestilação e PA refere-se ao peso da amostra.

$$R (\%) = 100 \times PO/PA - (PA \times umidade) / 5$$

EQUAÇÃO 2 - O rendimento do óleo essencial de folhas secas foi obtido através da seguinte equação: onde, R(%) corresponde ao rendimento de óleo essencial, PO é o peso do óleo obtido após a hidrodestilação e PA refere-se ao peso da amostra.

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

A quantificação e análise química dos constituintes do óleo essencial foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da UFMG (Campus de Belo Horizonte), pela combinação de técnicas de Cromatografia de Fase Gasosa de Alta Resolução (CG-FID) acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM).

Nas análises dos constituintes voláteis do óleo por Cromatografia de Fase Gasosa foi utilizado um Cromatógrafo a Gás HP 7820A (Agilent). As amostras foram diluídas em clorofórmio (1%), sendo as condições cromatográficas as seguintes: Coluna: HP5 30m x 0,32mm x 0,25 μ m (Agilent). Temp.: Coluna: 50°C (3min), 3°C /min, até 220°C. Injetor: 220°C Split (1:50). Detector FID: 240°C. Gás de arraste: H₂ a 3 ml/min. Vol. de injeção: 2.0 ul. Software de aquisição de dados: OPENLAB (Agilent).

As condições do CG-EM foram as seguintes: As análises foram realizadas em um equipamento GCMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu). Coluna: Rxi-1MS 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (Restek). Temp coluna: 50°C (3min), 3°C /min, até 220°C. Injetor: 220°C Split (1:50), Interface CG-MS a 240°C. Detector MS (Impacto eletrônico a 70eV) a 220°C. Gás de arraste: Hélio a 3.0 ml/min. Vol. de injeção: 1.0 ul. Software de aquisição de dados: GCMS Solution (Shimadzu).

As concentrações dos constituintes voláteis de cada tratamento foram expressas pela porcentagem média da área relativa dos picos cromatográficos.

Os constituintes voláteis foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de *n*-alcanos e por comparação dos espectros de massa do banco de dados da biblioteca espectral: NIST11 (NIST, 2011).

3.5 Caracterização do crescimento

As medidas de crescimento constituídas pelos indicadores altura da parte aérea, diâmetro do coleto, massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular, massa seca total e razão parte aérea raiz ($PA/R = MSPA/MSRA$), foram determinadas antes da aplicação do elicitor (plantas com 98 dias) e 10 dias após a aplicação do elicitor ao final do experimento (plantas com 108 dias).

As medidas de crescimento em altura foram realizadas com régua graduada de 50 cm a partir do coleto até o ápice do ramos ortotrópicos e o diâmetro na região do coleto com auxílio de um paquímetro analógico. Os valores de massa seca da parte aérea e raízes foram obtidos a partir da secagem do material em estufa de circulação forçada a ± 65 °C até atingir massa constante, seguido de pesagem em balança analítica de precisão.

3.6 Quantificação de macro e micromoléculas

Para a avaliação de macro e micromoléculas (biomoléculas) do metabolismo primário a coleta do material foi realizada no fim do experimento (10 dias após elicitação). Foram coletados 3 pares de folhas completamente desenvolvidos em 4 plantas para cada condição, e posteriormente secas em estufa de circulação forçada a ± 65 °C até atingir massa constante.

Na preparação do extrato 200mg de matéria seca juntamente com tampão fosfato de potássio 0,1M (pH7,0), foram levados ao banho-maria por 30min à 40°C, logo em seguida o extrato foi centrifugado a 10.000 G durante 20min, sendo o sobrenadante coletado e o processo de centrifugação repetido após adição de mais tampão, logo após a nova coleta do sobrenadante o material foi armazenado à -20°C.

Para a quantificação das biomoléculas açúcares solúveis totais, açúcares redutores, proteínas totais e aminoácidos foram utilizados métodos espectrofotométricos da Antrona, Ácido Dinitrosalicílico - DNS, Bradford e Ninhidrina, cujos protocolos foram inicialmente recomendados, respectivamente, por Yemm e Willis (1954); Miller (1959), Bradford (1976) e Yemm e Coccking (1955), todos com modificações.

3.7 Análises do sistema antioxidante

Para análise do sistema antioxidante das plantas foram avaliadas as atividades das enzimas Dismutase do Superóxido (SOD) e Catalase (CAT). Além da quantificação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica.

A coleta do material foi realizada entre 10 e 11 horas da manhã, em quatro tempos. Os intervalos de coleta foram: 0 dias, representa a primeira coleta 60 minutos após aplicação e 1, 2 e 3 dias após a elicitação. Foram selecionadas 5 plantas por tratamento e de cada planta foram coletadas quatro folhas totalmente expandidas. As amostras foram armazenadas no freezer a -80°C, até o preparo do extrato vegetal.

Para a obtenção do extrato para a quantificação das enzimas SOD e CAT 200mg do material vegetal armazenado foram macerados com nitrogênio líquido e antioxidante PVPP (polivinilpirrolidona). O meio de extração foi composto por tampão fosfato de potássio 100mM (pH 8,0), EDTA 0,1mM, ácido ascórbico 10mM e água destilada. Em cada microtubo foi acrescentado 1500µL do meio de extração. O extrato foi centrifugado a 13000g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante coletado para posterior análises.

Para a obtenção do extrato para a quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica 200 mg do material vegetal armazenado foram macerados em nitrogênio líquido e PVPP. Em cada microtubo contendo o extrato macerado foi adicionado 1500 µL de

ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e submetido à centrifugação a 12000 g por 15 minutos, a 4° C, sendo o sobrenadante coletado para posteriores análises.

3.7.1 Atividade da Dismutase do Superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada conforme metodologia descrita por GIANNOPOLITIS & RIES (1977) com modificações, onde 5 µL do sobrenadante foi pipetado em placa de acrílico visível juntamente com o meio de incubação. O meio de incubação foi composto por soluções de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 70 mM, EDTA 10 µM, NBT 1 mM, riboflavina 0,2 mM e água destilada. Em seguida, a placa foi iluminada com lâmpada fluorescente de 20W durante 7 minutos. A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm.

3.7.2 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por HAVIR & MCHALE (1987), onde 9 µL do sobrenadante foi pipetado em placa de acrílico UV juntamente com o meio de incubação. O meio de incubação foi composto por tampão fosfato de potássio 200mM (pH 7,0), peróxido de hidrogênio 250mM e água destilada. A atividade da enzima foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a cada 15 segundos, durante 3 minutos, através da leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm.

3.7.3 Teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi quantificado de acordo com a metodologia proposta por ALEXIEVA et al. (2001). Para a quantificação foi utilizado uma alíquota de 45µL do extrato mais o meio de reação, composto por tampão fosfato de potássio 10 mM (pH7,0) e iodeto de potássio 1 M. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 390nm. O teor de H₂O₂ foi obtido por meio de cálculos, baseados na curva padrão de peróxido de hidrogênio.

3.7.4 Peroxidação lipídica

A quantificação da peroxidação lipídica foi obtida pelo método de TBARS (ácido tiobarbitúrico). Para a quantificação foi utilizado uma alíquota de 125µL do extrato em microtubo contendo 250µL do meio de reação. O meio de reação foi composto por soluções de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% e ácido tricloroacético (TCA) 10%. O extrato juntamente com o meio de reação foi mantido incubado a 95°C por 30 minutos, e posteriormente submetido ao resfriamento rápido em gelo para paralisar a reação. Após a paralisação, 200µL do extrato foi pipetado em placa de acrílico. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 e a 600nm. A peroxidação lipídica foi obtida por meio de cálculos e expressa em nmol de MDA.g⁻¹ MF.

3.7.5 Fenilalanina amônia-liase (PAL)

Além do sistema antioxidante enzimático, foi avaliada também a atividade da Fenilalanina amônia-liase (PAL), principal enzima da via dos fenilpropanóides. A coleta do material foi a mesma para as enzimas do sistema antioxidante.

A atividade da enzima foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Mori, Sakurai e Sakuta (2000), com modificações. Para a obtenção do extrato, 300 mg do material vegetal foi macerado com nitrogênio líquido e PVPP.

Em cada microtubo contendo o extrato macerado foi adicionado 1500µL do meio de extração e submetido a centrifugação a 10000g por 15 minutos, a 4°C. O meio de extração foi composto por tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0) e betamercaptoetanol 10mM. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e 6µL 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 60min. Após a incubação as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280nm.

3.8 Análise estatística

Após coleta de dados, estes foram submetidos a análise de variância, sendo as médias submetidas ao teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). O programa estatístico utilizado foi o SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

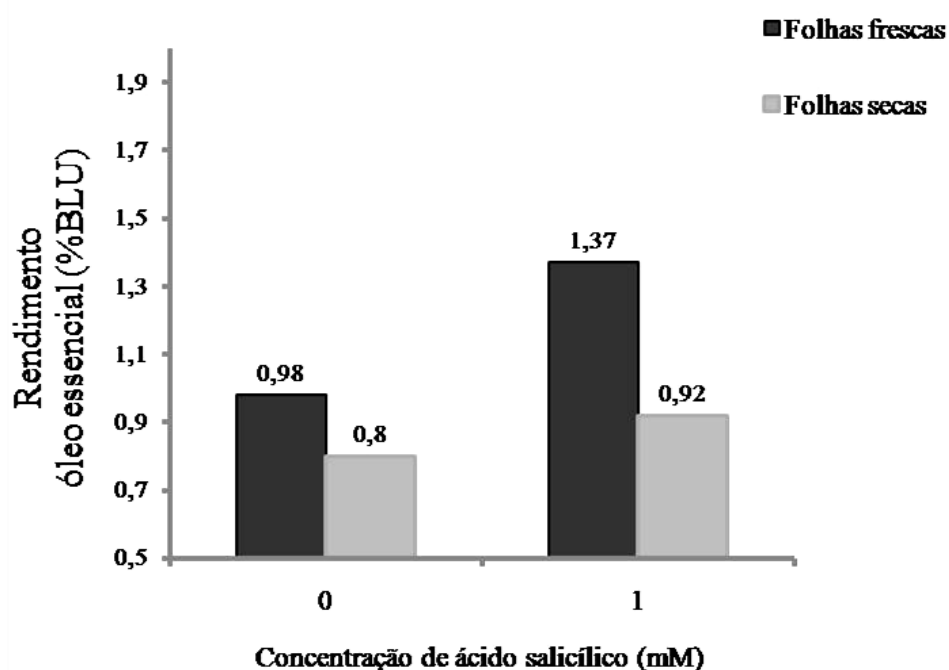
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teor dos óleos essenciais

4.1.1 Influência do ácido salicílico

Os óleos essenciais extraídos das folhas de *O. gratissimum* apresentaram uma variação no teor, devido a elicitação com AS (FIGURA 4). A elicitação destas plantas promoveu um aumento no teor do óleo essencial tanto em folhas frescas (28,5%) quanto em folhas secas (13,0%). Vários trabalhos relatam variações nos teores de óleos essenciais e metabólitos secundários após elicitação com AS, como em *Rivina humilis* L. (KHAN, KUMAR e GIRIDHAR, 2016) em *Foeniculum vulgare* Mill (Funcho) (HASHMI et al., 2012) e em *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz (NAIR et al., 2013). Gharib (2006) encontrou um maior teor nos óleos essenciais das espécies *Ocimum basilicum* (26,52%) e *Marjorana hortensis* (36,06%) quando estas foram elicidadas com AS. Um dado importante é que, o maior teor obtido para a espécie do gênero *Ocimum* foi na concentração de 1mM de AS, conforme concentração utilizada no presente trabalho.

Figura 4 - Teores de óleo essencial extraídos de folhas frescas e secas de *Ocimum gratissimum* 10 dias após elicitação com 1mM de ácido salicílico.



Fonte: Do autor (2018)

O aumento observado nos teores dos óleos essenciais ocorreu pelo fato do AS agir como um elicitador, induzindo respostas de defesa nas plantas. Como mencionado os elicitores agem mimetizando uma resposta nas plantas como se estas estivessem sendo atacadas por patógenos. Por isso mecanismos de defesa e resistência serão acionados (GHANADI e BAKHTIARIAN, 2013; GONDOR et al., 2016). Inicialmente, ocorrerá uma explosão oxidativa, a qual induzirá a atividade do sistema antioxidante das plantas, como consequência, fazem com que as plantas possam também produzir, em sua grande maioria, estes compostos secundários como forma de defesa (MANIVANNAN et al., 2016), como os terpenos e fenilpropanóides encontrados nos óleos essenciais, por exemplo (KANG, LI e GUO, 2014; SZYMANOWSKA et al., 2015). Além disso, o AS também é um hormônio vegetal, o qual possui papel importante nas plantas no sistema de defesa sistêmico. Neste processo o AS irá se deslocar interiormente nas plantas como um sinalizador, promovendo direto e indiretamente a ativação de genes responsáveis pelos processos de resposta de defesa (KHAN et al., 2015; VLOT, DEMPSEY e KLESSIG 2009).

4.1.2 Influência do tipo de material vegetal

Com os valores encontrados para os teores dos óleos essenciais de *O. gratissimum* a maior porcentagem foi observada nos óleos extraídos de folhas frescas (FIGURA 4). Pirbalouti, Salehi e Craker (2017) observaram um mesmo comportamento para o teor do óleo essencial de coentro (*Coriandrum sativum* L.) amostras de folhas frescas apresentaram um maior rendimento em relação as amostras secas à 40°C. Por outro lado, Borges et al. (2012) obtiveram um resultado oposto em relação as folhas frescas e secas (comerciais). Eles encontraram para o teor do óleo essencial de *O. gratissimum* um valor de 0,13% para folhas frescas e 1,02% de folhas secas. Todavia, um outro resultado foi divergente aos já mencionados. Negreiros, Miqueloni e Cartaxo (2015) encontraram uma grande variação nos rendimentos dos óleos essenciais extraídos de folhas frescas e secas (secagem ao sol) de vários acessos da espécie *Piper hispidinervum*, sugerindo uma variabilidade na produção destes metabólitos, inclusive dentro da mesma espécie.

O aumento da temperatura de secagem do material vegetal, pode resultar em um menor teor dos óleos essenciais. Isto ocorre devido à danificação das estruturas de armazenamento destes óleos, principalmente as glândulas secretoras. Com esta ruptura de

tecido os compostos químicos são liberados e volatilizados durante o processo de secagem (PIRBALOUTI, MAHDAD e CRAKER, 2013). Apesar de existir esta correlação positiva entre o aumento da temperatura de secagem e o aumento da perda de óleo essencial, esta variação em quantidade e qualidade difere significativamente de espécie para espécie. Deve-se portanto, ser considerados vários aspectos como o genótipo da planta; a variação ambiental; o processo de cultivo e colheita; o perfil químico dos óleos essenciais; bem como a estrutura química dos compostos e as estruturas morfológicas nas quais estes são armazenados nas plantas (ARGYROPOULOS & MÜLLER, 2014).

4.2 Qualidade dos óleos essenciais

4.2.1 Influência do ácido salicílico

Em todas as amostras de óleos essenciais obtidos de folhas de *O. gratissimum* do atual trabalho, foi encontrado um perfil químico composto por monoterpenos e sesquiterpenos distribuídos em treze compostos identificados (TABELA 2). Em relação ao tratamento com AS, o óleo essencial de *O. gratissimum* apresentou diferenças na qualidade de seus compostos químicos. Os compostos detectados foram os mesmos entre o tratamento e controle, porém, seus teores foram alterados em função da aplicação do AS. Gharib (2006) encontrou resultados equivalentes devido a aplicação do elicitor AS, sendo que os componentes foram os mesmos, porém em concentrações diversificadas.

Independente da procedência do material, fresco ou seco, os constituintes majoritários encontrados nos óleos essenciais foram β -pineno, germacreno-D e eugenol (TABELA 2). Mohr et al. (2017) encontraram no óleo essencial de *O. gratissimum* os seguintes compostos majoritários linalol, 1,8 - cineol, canfora e eugenol, sendo as plantas cultivadas em condição de campo e o óleo essencial extraído de folhas por hidrodestilação. Prabhu et al. (2009), em um trabalho de revisão, descreveram a composição do óleo essencial de *O. gratissimum* extraído por métodos diferentes, e os compostos majoritários encontrados foram eugenol, 1,8-cineol e β -cariofileno.

Tabela 2 - Teores dos compostos químicos identificados nos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, extraídos de folhas frescas e secas após eliciação com 1mM de ácido salicílico.

Compostos	RT ^a (min)	IK ^b	Controle	1mM	Controle	1mM
			Amostras Frescas (%)		Amostras Secas (%)	
α -pineno	5,45	975,08	0,00	0,00	0,28	0,42
β -pineno	7,06	1017,50	3,52	2,37	7,15	7,48
mirreno	7,40	1026,46	0,14	0,10	0,20	0,20
γ -terpineno	8,56	1057,01	0,39	0,20	1,25	0,95
<i>cis</i> -p-mentha-1(7)8-dien-2-ol	14,06	1201,92	0,39	0,20	1,17	1,02
<i>trans</i> -p-mentha-1(7)8-dien-2-ol	14,36	1209,80	0,14	0,11	0,90	0,71
eugenol	20,09	1361,01	85,78	89,42	76,51	75,72
iso-eugenol	20,27	1365,75	0,00	0,00	1,37	1,53
α -copaeno	20,91	1382,62	0,35	0,26	0,48	0,47
β -cariofileno	21,86	1407,72	0,99	0,81	1,29	1,25
germacreno D	24,30	1471,80	5,72	4,80	2,42	2,06
δ -cadineno	25,17	1494,81	0,27	0,23	0,16	0,17
oxido de cariofileno	28,01	1569,71	0,00	0,00	1,20	1,00
não identificados	-	-	2,28	1,50	5,61	7,01
Totais						
Monoterpenos hidrogenados	-	-	4,06	2,67	8,88	9,05
Monoterpenos oxigenados	-	-	86,32	89,74	79,95	78,98
Sesquiterpenos hidrogenados	-	-	7,34	6,09	4,35	3,96
Sesquiterpenos oxigenados	-	-	0,00	0,00	1,20	1,00
Total	-	-	100,00	100,00	100,00	100,00

Legenda: ^aTempo de Retenção; ^bÍndice de Kovats .

Fonte: Do autor (2018)

O composto químico majoritário dos óleos essenciais pode variar devido a fatores ambientais, genéticos e manejo agrônomico. Alguns quimiotipos são encontrados portanto para muitas espécies (NGUEMTCHOUIN et al., 2013). Em todas as amostras de óleos essenciais avaliadas de *O. gratissimum* o composto predominante encontrado foi o eugenol, sendo portanto, a espécie utilizada de quimiotipo eugenol. A elicitação das plantas de *O. gratissimum* modificou o teor de eugenol sintetizado nestas plantas. Foi encontrada uma variação entre o controle e o tratamento com AS de 6,58% em amostras frescas, e 0,79% em amostras secas (TABELA 2). Złotek, Majewska e Szymanowska (2016) também encontraram um aumento nos teores de eugenol e linalol no óleo essencial de *O. basilicum* quando as plantas foram tratadas com o elicitor ácido jasmônico.

O óleo essencial de *O. gratissimum* possui ação antioxidante comprovada. Ademais, já foi identificado e comprovado que o composto químico responsável por esta ação é o eugenol (DAMBOLENA et al., 2010; MAHAPATRA e ROY, 2014). Gharib (2006) trabalhando com algumas concentrações de AS encontrou diferenças no teor de eugenol em *O. basilicum*. Eles observaram que o aumento em eugenol nas plantas tratadas com AS em relação as plantas controle, foi explicado com o aumento da atividade antioxidante dos óleos essenciais. O eugenol sendo um fenilpropanóide pode vir a participar, também, de processos de defesa nas plantas como um antioxidante não enzimático. Trabalhos utilizando a aplicação de AS já demonstraram haver um aumento na expressão de genes envolvidos na biossíntese de fenilpropanóides e um aumento relacionado na atividade antioxidante das plantas (GONDOR et al., 2016; SARROU et al., 2015).

4.2.2 Influência do tipo de material vegetal

A procedência do material, fresco ou seco, para a extração dos óleos essenciais influenciou na qualidade química dos óleos essenciais de *O. gratissimum*. Dos treze compostos químicos identificados, três deles no geral não apareceram nos óleos essenciais de folhas frescas (α -pineno, isoeugenol e óxido de cariofileno) (TABELA 2). Esta diferença, pode ser explicada devido ao processo de secagem das folhas para extração de óleo essencial. Como um exemplo, tem-se o composto isoeugenol, o qual foi encontrado somente nas amostras de folhas secas, que pode ser formado a partir de eugenol na presença de calor. Por mais que a temperatura empregada tenha sido a recomendada, sabe-se que, durante este

processo de secagem, compostos químicos podem ser perdidos e/ou convertidos em outros. Isto ocorre devido à ação da temperatura na ruptura de estruturas armazenadoras de óleos essenciais e a volatilização dos mesmos, principalmente os composto mais leves, como os monoterpenos (ARGYROPOULOS & MÜLLER, 2014; NEGREIROS, MIQUELONI E CARTAXO, 2015).

O composto majoritário eugenol apresentou um maior teor nas amostras frescas, havendo uma diferença de quase 10% entre as duas amostras (frescas e secas) (TABELA 2). Os resultados encontrados no trabalho de Borges et al. (2012), com plantas de *O. gratissimum*, confirmam esta relação para o teor de eugenol extraído de folhas frescas e secas. De acordo com Luz, Ehlert e Innecco (2009), o óleo essencial de Alfavaca quando submetido ao processo de secagem sofre altos danos em sua composição, principalmente pela queda no teor do seu constituinte majoritário, o eugenol. Visto que este é o maior responsável pela característica antioxidante do óleo essencial, esta queda pode prejudicar portanto a qualidade do óleo essencial.

4.3 Caracterização do crescimento

Os dados observados das variáveis resposta para a caracterização do crescimento das plantas de *O. gratissimum* após elicitación, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos (TABELA 3). Provavelmente, o tempo de dez dias entre a aplicação do elicitor e a avaliação das variáveis, pode ter sido curto e não ter sido suficiente para observar diferenças no incremento em altura e massa seca das plantas. Gorni et al. (2017) observaram um efeito dose dependente para biomassa seca de raízes de funcho (*Foeniculum vulgare*). Conforme aumentava a dose de AS, diminuía a biomassa seca de raízes; entretanto para biomassa seca total não houve diferença entre as doses aplicadas. Dong, Wan e Liang (2010), relatam o decréscimo em matéria seca na cultura de células de *Salvia miltiorrhiza* quando tratadas com AS. Enquanto Gharib (2006), encontrou um efeito positivo para a aplicação de AS em plantas de *Ocimum gratissimum* e *Marjorana hortensis*. O efeito negativo no crescimento, encontrado pelos autores, pode estar relacionado a um desvio nas rotas biossintéticas, uma vez que as moléculas que participam dos processos do metabolismo primário irão ser desviadas para o metabolismo secundário para a demanda de compostos de defesa, causando provavelmente, um decréscimo no acúmulo de biomassa (CHONG et al., 2005). Por outro lado, o efeito contrário de aumento na biomassa pode ser explicado pela influencia do elicitor nas rotas do

metabolismo primário de maneira positiva. Uma vez que como fitohormônio está envolvido também em processos de crescimento e desenvolvimento (GORNI et al., 2017). No entanto, observa-se no geral, que a elicitação com AS apresenta respostas variáveis no crescimento de plantas, podendo essas serem específicas para cada espécie e ainda, considerando as doses do elicitor bem como as condições ambientais no momento da aplicação.

Tabela 3 - Valores médios da altura (cm), BSPA= biomassa seca da parte aérea (g), BSR= biomassa seca da raiz (g), BST= biomassa seca total (g) e PA/R= relação parte aérea raiz de plantas de *Ocimum gratissimum* avaliadas 10 dias após elicitação com 1mM de ácido salicílico.

Tratamentos	Altura (cm)	BSPA (g)	BSR (g)	BST (g)	PA/R
Controle	7,80 a	3,20 a	1,86 a	5,06 a	1,73 a
1mM	5,97 a	2,67 a	1,81 a	4,48 a	1,58 a

Legenda: Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018)

4.4 Moléculas do metabolismo primário

Foram avaliadas as micro e macromoléculas provenientes do metabolismo primário como os aminoácidos totais, proteínas totais, açúcares redutores, açúcares solúveis totais e sacarose. Em relação aos aminoácidos e açúcares (totais, redutores e sacarose) não foram encontradas diferenças entre os tratamentos (TABELA 4). No que diz respeito as proteínas quantificadas neste trabalho, houve uma queda de 16% das mesmas nas plantas tratadas com AS. Esta redução pode ser explicada pela produção de EROs induzida pelo elicitor, a qual foi identificada pela quantificação de H₂O₂ (dados discutidos a diante). As espécies reativas produzidas, podem vir a alterar a conformação de proteínas, degradação e inativação das mesmas devido ao estresse oxidativo gerado. Além disto, estas moléculas influenciam na regulação de genes e fatores de transcrição relacionados a produção de defesa nas plantas (HAYAT et al., 2010). Um outro motivo, pode estar relacionado ao desvio ocorrido nas rotas metabólicas perante a produção de compostos secundários, como por exemplo o aumento no teor de eugenol observado (TABELA 4). Hayat et al. (2010) mencionam que quando foram utilizadas concentrações elevadas de AS foram encontrados menores valores para a

quantificação de proteínas totais. No entanto, Yin et al. (2016), encontrou um resultado oposto, foi observado um aumento de proteínas solúveis nas plantas tratadas com AS, sendo este aumento proporcional a concentração utilizada do elicitor. Gharib (2006) também encontrou maiores valores para a quantificação de proteínas totais. Além destas, um maior aumento foi observado para carboidratos, aminoácido totais e prolina.

Tabela 4 - Efeito da elicitação com ácido salicílico (1mM) no conteúdo de aminoácidos (μmol de aa g^{-1} MS), proteínas totais (μg proteína g^{-1} MS), açúcares redutores (μmol de glicose g^{-1} MS), açúcares solúveis totais (μmol de glicose g^{-1} MS) e sacarose (μmol de glicose g^{-1} MS) de *Ocimum gratissimum*.

Tratamentos	Aminoácidos (μmol de aa g^{-1} MS)	Proteínas Totais (μg proteína g^{-1} MS)	Açúcares redutores (μmol de glicose g^{-1} MS)	Açúcares solúveis totais (μmol de glicose g^{-1} MS)	Sacarose (μmol de glicose g^{-1} MS)
Controle	26,388 a	16056,684 a	202,846 a	112,935133 a	87,492 a
1mM	30,053 a	13833,170 b	177,164 a	117,689267 a	65,367 a

Legenda: Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018)

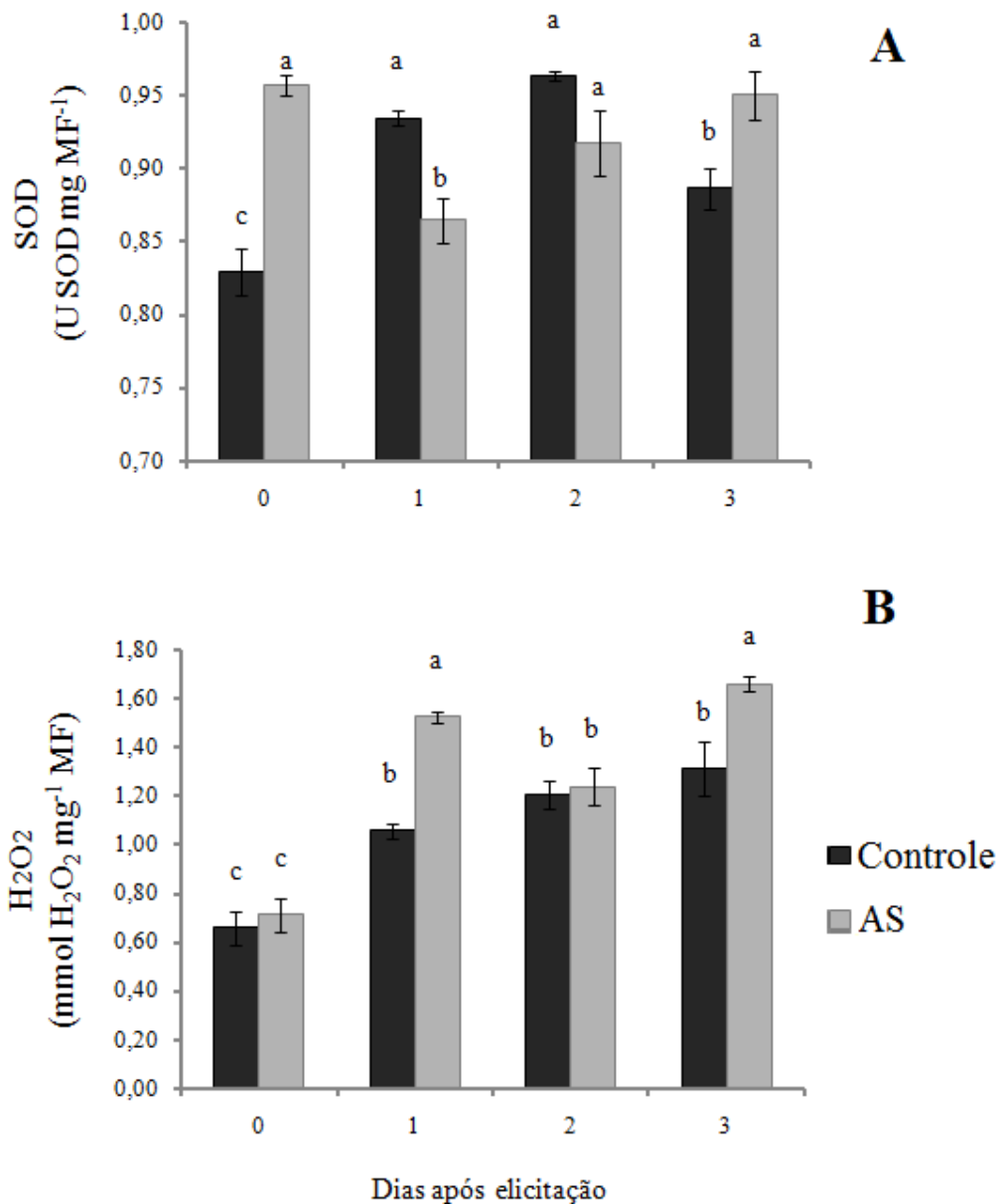
4.5 Análises do sistema antioxidante

O AS naturalmente é responsável pelos processos de sinalização de respostas locais e/ou sistêmicas induzidas pelo ataque de patógenos nas plantas (JANDA et al., 2010). Sua aplicação foliar portanto, pode vir a ampliar estas respostas, sendo por esta e outras razões, que este composto é utilizado como elicitor. Um dos primeiros eventos metabólicos envolvidos na resposta das plantas a aplicação de AS é o seu reconhecimento e logo a produção de EROs, como exemplo o H_2O_2 . Posteriormente, ao estresse oxidativo gerado pelas EROs, ainda sob influência dos elicitores, ocorre a ativação de enzimas do sistema antioxidante (ESTRADA et al., 2016; LEE, PARK, e PAEK, 2015; MANIVANNAN et al., 2016; YIN et al., 2016;) as quais também atuam como sinalizadores nas plantas e são importantes para eliminar o excesso destas EROs (MIGNOLET-SPRUYT et al., 2016). De acordo com os resultados observados a aplicação foliar de AS em plantas de *O. Gratissimum*

influenciou na ativação da sinalização de defesa nas plantas. O que pode ser confirmado com o aumento na produção do óleo essencial na etapa final, e com os resultados apresentados a seguir.

Foi observado que a atividade da enzima SOD durante a primeira avaliação foi maior nas plantas elicitadas do que nas plantas controle (FIGURA 5). Este pode ser um indício de que logo nas primeiras horas após elicitação com AS, deu-se início ao processo de sinalização por parte da produção de EROs. No primeiro momento, provavelmente, ocorreu a formação de superóxido (não quantificado) e com isto a ativação da enzima SOD. Em relação as avaliações seguintes para as plantas elicitadas, foi observada uma queda na atividade da SOD durante a segunda avaliação, logo depois os valores retomaram aos valores iniciais e permaneceram constantes até a última avaliação realizada. Segundo Manivannan et al. (2016), a enzima SOD é responsável pela transformação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), sendo sua intervenção fundamental para dar início ao processo de detoxificação das EROs. Com a produção de H_2O_2 catabolizada por essa enzima, a SOD torna-se relevante na rede de sinalização, uma vez que a molécula de H_2O_2 é considerada um mensageiro secundário (LEHMANN et al., 2015). De acordo com os dados obtidos neste trabalho e aqueles documentados na literatura (LEE, PARK, e PAEK 2015; WANG et al., 2015), o aumento da atividade enzimática nas plantas tratadas com AS é explicado pela ação do elicitor na ativação do sistema de defesa das plantas. A enzima SOD portanto, pode ser considerada como uma enzima sinalizadora, uma vez que esta transforma o superóxido a H_2O_2 influenciando na produção de um mensageiro secundário e nos próximos passos para a ativação dos mecanismos de defesa das plantas (MIGNOLET-SPRUYT et al., 2016).

Figura 5 - Efeito da elicitação com ácido salicílico (1mM) na atividade enzimática da Dismutase do Superóxido (U SOD $mg\ MF^{-1}$) (A) e no teor de peróxido de hidrogênio ($mmol\ H_2O_2\ mg^{-1}\ MF$) (B) em folhas de *Ocimum Gratissimum*.



Legenda: Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot, com 5% de significância ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018)

Para as plantas controle foi observado um aumento da primeira para a segunda avaliação na atividade da enzima SOD, e a partir deste ponto os valores mantiveram-se constantes (FIGURA 5). Este aumento influenciou diretamente na resposta observada para os teores de H₂O₂, sendo que durante a segunda avaliação foi observado um aumento nos teores em relação a primeira observação e estes também mantiveram-se constantes até a última avaliação. Diferente da resposta imediata obtida pelas plantas elicidadas devido a aplicação do AS, os resultados obtidos para as plantas controle sugerem uma possível comunicação entre

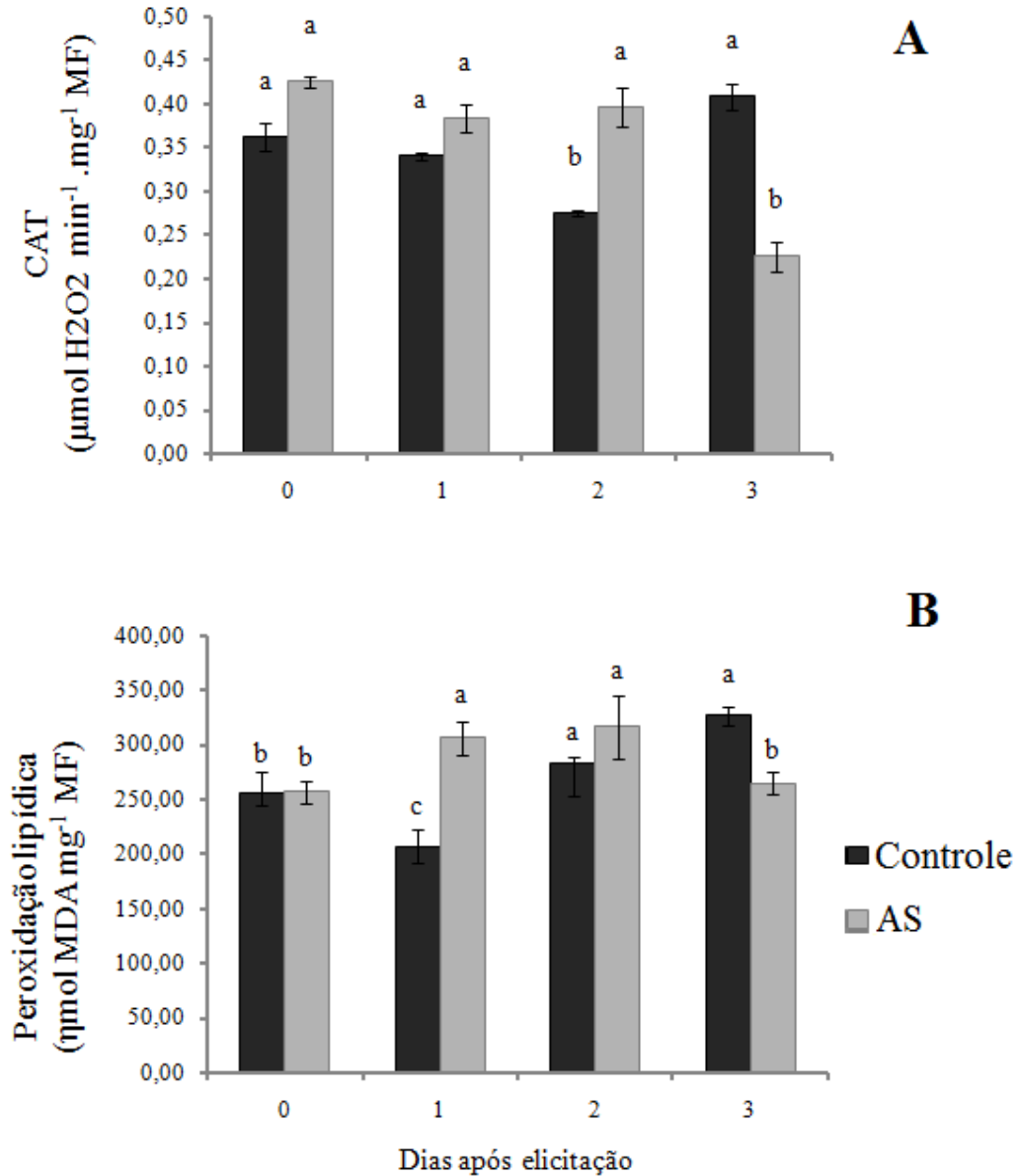
as plantas controle e elicidadas. Uma vez que, durante o período experimental, até 10 dias após aplicação de AS, as condições climáticas e ambientais foram relativamente iguais. Portanto, este aumento na atividade da SOD e na produção de H_2O_2 nas plantas controle, observados da primeira para a segunda avaliação pode ter ocorrido em parte pela sinalização advinda das plantas que foram tratadas com AS. As plantas controle podem ter percebido sinais advindos das plantas elicidadas, uma vez que nestas a ativação da enzima SOD ocorreu nas primeiras hora após a elicitação (FIGURA 5). Com isso, deu-se início ao processo de sinalização de defesa por meio da explosão oxidativa e consequente ativação das enzimas antioxidantes como a SOD. Sabe-se que existem comunicações entre plantas por meio de compostos voláteis e compostos de folhas verdes, os quais induzem plantas vizinhas a iniciarem seu processo de sinalização para defesa, na maioria das vezes, contra patógenos e herbívoros (MAAG et al., 2014). Shiojiri et al. (2015) demonstraram que compostos voláteis, como o 1,8-cineol and β -cariofileno foram responsáveis pela redução da herbivoria em plantas de Artemísia (*Artemisia tridentata*). Os autores ainda argumentam que tais compostos emitidos pelas plantas, representam um sinal generalizado de risco, quando percebidos por outras plantas.

Quanto aos teores de H_2O_2 quantificados para as plantas elicidadas, estes acompanharam a atividade da enzima SOD (FIGURA 5). A maior atividade observada durante a primeira avaliação para a SOD nas plantas elicidadas, consequentemente, foi o que influenciou na maior produção de H_2O_2 observada durante a segunda avaliação nestas plantas. Enquanto, a queda na produção de H_2O_2 durante a terceira avaliação, corresponde provavelmente, a baixa atividade observada da enzima SOD na avaliação anterior. O H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio a qual é produzida espontaneamente ou por ação de enzimas, como a SOD. Esta molécula está envolvida na sinalização de processos celulares relacionados ao crescimento, desenvolvimento e principalmente a sinalização de defesa nas plantas; tanto para estresse biótico quanto para abiótico (LEHMANN et al., 2015). Diferente das outras EROs o H_2O_2 possui uma vida longa, é mais estável e é capaz de difundir-se a distâncias maiores dentro dos tecidos vegetais. Por estes motivos, torna-se uma molécula de interesse para o estudo do sistema oxidativo das plantas (SHARMA et al., 2012). Em outros trabalhos este aumento em H_2O_2 nas plantas após elicitação, também foi demonstrado, inclusive para outros tipos de elicitores (DONG, WAN e LIANG, 2010; DOUSSEAU et al., 2016; MANIVANNA et al., 2016; WANG et al., 2015; YIN et al., 2016). Este aumento observado na produção de H_2O_2 além de ser explicado pelo aumento da atividade da enzima SOD, pode

estar relacionado a produção espontânea devido ao mecanismo de ação dos elicitores, como mencionado. Após o reconhecimento destes compostos nas plantas por receptores de membranas, enzimas NADPH oxidases são ativadas e uma explosão oxidativa é iniciada (KHAN et al., 2015; LEHMANN et al., 2015). Acreditava-se que as EROs possuíam apenas um papel negativo nas plantas, causando danos oxidativos. Entretanto, a participação destas moléculas como mensageiros secundários na sinalização de defesa é essencial, principalmente o H_2O_2 por deter maior vida longa. Além de dispor de notável rapidez em sua sinalização, as moléculas de H_2O_2 são capazes de participarem de diversas vias do metabolismo conforme sua localização (MIGNOLET-SPRUYT et al., 2016).

Além da SOD a enzima CAT também é responsável por catalisar a dismutação de H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (SHARMA et al., 2012). Durante a primeira e segunda avaliação os dados observados foram semelhantes entre as plantas controle e elicidadas (FIGURA 6), já na terceira avaliação a atividade da CAT das plantas controle sofreu uma queda e com isso a atividade das plantas tratadas foi maior, enquanto na quarta avaliação a queda da atividade ocorreu nas plantas elicidadas, apresentando desta vez as plantas controles uma maior atividade. As quedas observadas podem ser explicadas pela intensidade e constância da sinalização que estava ocorrendo nas plantas, e esta pode vir a amplificar ou minimizar a atividade enzimática (SHARMA et al., 2012). Esta queda pode estar relacionada também ao aumento da operação de outras enzimas peroxidativas como a Ascobrato Peroxidase (APX) e a Peroxidase (POD), que também atuam na dismutação do peróxido de hidrogênio. Segundo Sharma et al. (2012) a APX por exemplo, possui maior afinidade pelo H_2O_2 do que a CAT. Dong, Wan e Liang, (2010) detectaram em cultura de células de *Salvia miltiorrhiza* elicidadas com AS no início do período pós elicitação alguns picos na atividade da enzima, enquanto que ao decorrer do tempo essa atividade exibiu uma queda atingindo valores próximos ao tratamento controle. Hayat et al. (2010), em sua revisão menciona vários resultados de trabalhos em relação a atividade da enzima CAT após aplicação exógena de AS. Eles observaram que a resposta enzimática é bastante variável, podendo haver, aumentos e quedas em sua regulação para as várias espécies estudadas e os tempos escolhidos para avaliações.

Figura 6 - Efeito da elicitação com ácido salicílico (1mM) na atividade da enzima Catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ MF}$) (A) e na peroxidação lipídica ($\eta\text{mol MDA mg}^{-1} \text{ MF}$) (B) em folhas de *O. Gratissimum*.



Legenda: Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot, com 5% de significância ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018)

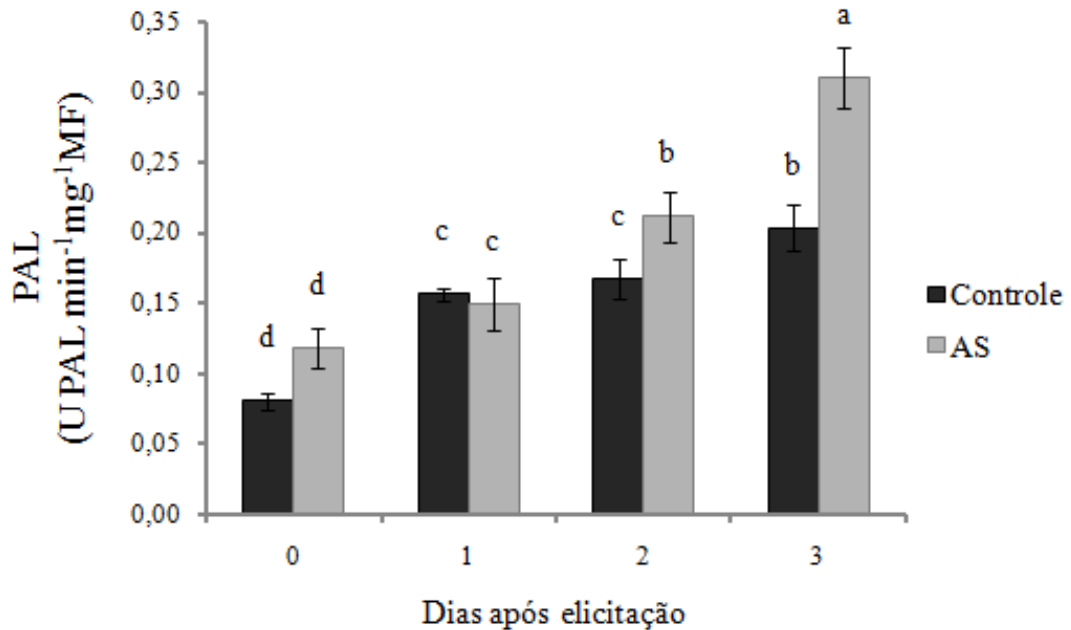
Em resposta a produção de H_2O_2 induzida pela aplicação de AS, os níveis de peroxidação lipídica tiveram um aumento de maneira geral tanto para as plantas elicitadas quanto para as plantas controle (FIGURA 6). Durante a primeira e terceira avaliação não houve diferença entre as plantas controle e elicitadas. No entanto, para as plantas controle em relação ao tempo, o nível de peroxidação lipídica aumentou durante a terceira avaliação e

manteve-se constante até o final. Já para as plantas elicitadas houve um aumento logo na segunda avaliação, correspondendo ao mesmo tempo onde houve um aumento observado para o teor de H₂O₂. Na quarta avaliação enquanto as plantas controle estavam com o nível de peroxidação alto, as plantas elicitadas apresentaram uma queda na peroxidação lipídica. Uma justificativa para esta queda seria a atividade elevada da enzima CAT observada na avaliação anterior. Uma outra justificativa seria também um aumento na atividade da enzima PAL, responsável pela produção de compostos fenólicos, os quais podem atuar como antioxidantes não enzimáticos (GONDOR et al., 2016). Na revisão de Hayat et al. (2010), vários trabalhos são mencionados onde o AS promove tanto aumento quanto decréscimo na peroxidação lipídica. Estes resultados são justificáveis pelo fato da aplicação do AS induzir o processo de sinalização nas plantas, causando inicialmente a produção de EROs, como foi observado.

A elicitação com AS afetou a atividade da enzima PAL ao longo do tempo nas plantas de *O. gratissimum* (FIGURA 7). Os valores encontrados para ambas condições seguem um comportamento semelhante ao encontrado para o H₂O₂. Os dados possuem uma tendência de aumento ao longo do tempo. Outros autores também observaram a influência da elicitação com AS no aumento da atividade da PAL em plantas de trigo (GONDOR et al., 2016), e na cultura de células de *S. miltiorrhiza* (DONG, WAN E LIANG 2010). Dehghan et al. (2014) observaram um aumento na expressão gênica, relacionada a enzima PAL em plantas de *Carthamus tinctorius* L., após tratamento com AS. Este aumento detectado foi ao longo de 3,6 e 24 horas após aplicação de AS. Na última avaliação, 24h depois, o aumento foi superior aos demais, resultado este semelhante ao observado.

Estes resultados demonstram, que realmente o AS influi na rota biossintética dos fenilpropanóides. Uma vez que, a enzima PAL é responsável por catalisar a conversão de L-fenilalanina a ácido *trans*-cinâmico, sendo este um dos primeiros passos da via dos fenilpropanóides (SONG e WANG, 2011). Além da atividade das enzimas na detoxificação das EROs, os fenilpropanóides também atuam na eliminação destas moléculas. (DEHGHAN et al., 2014). O que pode ser correlacionado com a maior produção de óleo essencial encontrado.

Figura 7 - Efeito da elicitação com ácido salicílico (1mM) na atividade da enzima fenilalanina amônia liase (U PAL min⁻¹mg⁻¹MF) em folhas de *O. Gratissimum*.



Legenda: Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knot, com 5% de significância ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2018)

Com os resultados obtidos para a atividade da PAL, podem ser relacionados ainda os níveis de peroxidação lipídica com a atividade enzimática. A queda da peroxidação lipídica nas plantas tratadas (FIGURA 6) observada durante a quarta avaliação, pode estar associada ao aumento da atividade da PAL nestas plantas. A ativação da enzima PAL induzirá a síntese de compostos fenólicos, e tais compostos também participam do sistema antioxidante das plantas, mitigando portanto, a peroxidação lipídica ocasionada pela sinalização induzida pelo AS (KHAN et al., 2015).

5 CONCLUSÃO

A elicitação com ácido salicílico promoveu um aumento nos valores encontrados para os teores do óleo essencial extraído de folhas de *O. gratissimum*. Em relação a qualidade do óleo essencial, o ácido salicílico também influenciou na variação do teor relativo de seu composto majoritário, eugenol, em quase 7%. Sendo esta observação importante, pois tal composto é responsável pela ação antioxidante do óleo essencial desta espécie.

Durante a caracterização dos óleos essenciais extraídos de folhas frescas e secas de *O. gratissimum*, foi observado um maior rendimento no óleo essencial extraído de folhas frescas. Quanto a qualidade destes óleos essenciais para os compostos majoritários o β -pineno teve um maior teor nas amostras secas, enquanto o germacreno-D e eugenol obtiveram maiores teores nas folhas frescas.

Foi demonstrado que a elicitação de plantas de *O. gratissimum* com a concentração de 1mM de AS induziu o processo de sinalização nestas plantas. O elicitor, mimetizou uma resposta de sinalização nas plantas tratadas, o que ocasionou nestas a produção de EROs, como o H_2O_2 , a ativação da enzima SOD, que também age como agente sinalizador; e maior nível de peroxidação lipídica. A enzima PAL, responsável pela rota de biossíntese de compostos fenólicos também teve sua atividade aumentada na elicitação com AS, conduzindo as plantas a ativarem seu sistema de defesa.

REFERÊNCIAS

- AGURLA, S.; RAGHAVENDRA, A. S. Convergence and divergence of signaling events in guard cells during stomatal closure by plant hormones or microbial elicitors. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 7, p. 1332, 2016.
- AHMAD, S. et al. In vitro production of alkaloids: factors, approaches, challenges and prospects. **Pharmacognosy Reviews**, Mumbai, v. 7, n. 13, p. 27–33, 2013.
- ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.24, n.12, p.1337-1344, 2001.
- ANAYA, F. et al. Influence of salicylic acid on seed germination of *Vicia faba* L. under salt stress. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, Riyadh, v.17, m. 1, p. 1-8, 2015.
- ARGYROPOULOS, D.; MÜLLER, J. Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 118-124, 2014.
- 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.
- 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.
- BORGES, A. M. et al. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.656-665, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. 2015
- BRITO, A. M. G. et al. Aromaterapia: da gênese a atualidade. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.15, n.4, p.789-793, 2013.
- CHONG, T. M. et al. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. **Process Biochemistry**, Gangtok, v. 40, p. 3397-3405, 2005.

- DAMBOLENA, J. S. et al. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v, 11, n. 2, p. 410-414, 2010.
- DEHGHAN, S. et al. Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*. **Bioscience reports**, v. 34, n. 3, p. e00114, 2014.
- 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**, v. 148, p. 99–104, 2010.
- DOUSSEAU, S. et al. Aplicação exógena de quitosana no sistema antioxidante de Jaborandi. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.46. n. 1. p. 191-197, 2016.
- EGESIE, U. G. et al. Safety and hypoglycaemic properties of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* in streptozotocin induced diabetic rats. **Nigerian Journal Of Physiological Sciences**, v. 21, n. 1-2, p. 31-35, 2006.
- ESTRADA, K. R. et al. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 2, p. 182, 2016.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, UFLA, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GANDHI, S.G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y.S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**, v. 241, n. 2, p. 303-317, 2014.
- GHANADI, F; BAKHTIARIAN, B. Changes of natural compounds of *Artemisia annua* L. by methyl jasmonate and silver nanoparticles. **Advances in Environmental Biology**, p. 2251, 2013.
- GHARIB, F. A. E.L. Effect of Salicylic Acid on the Growth, Metabolic Activities and Oil Content of Basil and Marjoram. **International Journal of Agriculture and Biology**, Pakistan, v. 8, n. 4, 2006.
- GHARIB, F. A.; HEGAZI, A. Z. Salicylic Acid Ameliorates Germination, Seedling Growth, Phytohormone and Enzymes Activity in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under Cold Stress. **Journal of American Science**, v. 6, n.10, 2010.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 309-314, 1977.
- GONDOR, O. K. et al. Salicylic Acid Induction of Flavonoid Biosynthesis Pathways in Wheat Varies by Treatment. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1447, 2016.

- GORNI, P. H. et al. Increased biomass and salicylic acid elicitor activity in fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 20, p. e2016172, 2017.
- GU, J.T. et al. Effects of salicylic acid on seed germination and biochemical properties in seedlings of *Lactuca sativa* L. under high temperature stress. **Acta Horticulturae**, Brisbane, 1123. ISHS. 2016.
- 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. 550, 2014
- HASHMI, N. et al., Exogenous salicylic acid stimulates physiological and biochemical changes to improve growth, yield and active constituents of fennel essential oil. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 68, p. 281–291, 2012.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- HAYAT, Q. et al. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 14–25, 2010.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- JANDA, T. et al. Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 36, p. 2537-2546, 2014.
- KANG, G.; LI, G.; GUO, T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 36, p. 2287–2297, 2014.
- KANG, Y. M. et al. Over expression of IPP isomerase and limonene synthase enzymes in *Mentha spicata* and their influence on the terpenoid metabolism. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 20, n. 2, 2015
- KIM, H. J. et al. Effect of Methyl Jasmonate on Secondary Metabolites of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, München, v. 54, p. 2327-2332, 2006.
- KHAN, M. I. R. et al. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 462, 2015.
- KHAN, M. I.; KUMAR, A.; GIRIDHAR, P. Betalains and expression of antioxidant enzymes during development and abiotic stress in *Rivina humilis* L. berries. **Turkish Journal of Botany**, Ankara, v. 40, p. 28-36, 2016.

KOEDUKA, T. et al. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 26, p. 10128-10133, 2006.

KOLAREVIC, M. K. et al. Influence of sodium salicylate on rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid accumulation by *Salvia officinalis* L. shoots grown *in vitro*. **Biotechnology Letter**, Heidelberg, v. 37, p. 1693-1701, 2015.

LEE, E. J.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dijon, v. 120, p. 1 -10, 2015.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum,. 544 p. 2008.

LUZ, J. M. Q.; EHLERT, P. A. D.; INNECCO, R. Horário de colheita e tempo de secagem da alfavaca-cravo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 539-542, 2009.

MAAG, D. et al. Defensive weapons and defense signals in plants: some metabolites serve both roles. **BioEssays**, v. 37, n. 2, p. 167-174, 2014.

MIGNOLET-SPRUYT L. et al. Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 13, p. 3831–3844, 2016.

MAHAPATRA, S. K.; ROY, S. Phytopharmacological approach of free radical scavenging and antioxidative potential of eugenol and *Ocimum gratissimum* Linn. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. S391-S397, 2014.

MANIVANNAN, A. et al. Chemical Elicitor-Induced Modulation of Antioxidant Metabolism and Enhancement of Secondary Metabolite Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch Abinaya. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 399, 2016.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MOHR, F. B. M. et al. Antifungal activity, yield, and composition of *Ocimum gratissimum* essential oil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, 2017.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Changes in PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and Ds-Mn) activity during anthocyanin synthesis in suspension culture of *Fragaria ananassa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dijon, v. 62, p. 135–139, 2000.

NAIR, V. D. et al. Elicitation of pharmacologically active phenolic compounds from *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 406–415, 2013.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. PC version 2.0 of the **NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library**. Gaithersburg, 2011.

NEGREIROS, J. R. da S.; MIQUELONI, D. P.; CARTAXO, C. B. da C. Yield of essential oil and safrole content based on fresh and dry biomass of long pepper in the Brazilian Amazon. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 1, p. 75 - 80, 2015.

NGUEMTCHOUIN, M. G. M. et al. *Ocimum gratissimum* essential oil and modified montmorillonite clay, a means of controlling insect pests in stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 52, p. 57-62, 2013.

OLIVEIRA, L. B. S. et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.2, p.511-523, 2016.

PACHECO, F.V. et al. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 251–257, 2016.

PIMENTEL, F.A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, 2006.

PIRBALOUTI, A.G., MAHDAD, E., CRAKER, L., Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. **Food Chemistry**, v. 9, n. 1, 2013.

PIRBALOUTI, A. G.; SALEHI, S.; CRAKER, L. Effect of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil from the aerial parts of coriander. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 4, p. 35–40. 2017.

PRABHU, K. S. et al. *Ocimum gratissimum*: A Review of its Chemical, Pharmacological and Ethnomedicinal Properties. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 1, p. 1-15, 2009.

PRAKASH, B. et al. Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B1 contamination of spices. **Food Research International**, v. 44, p. 385–390, 2011.

RAHIMI, S. et al. Effect of Salicylic Acid and Yeast Extract on the Accumulation of Jasmonic Acid and Sesquiterpenoids in *Panax ginseng* Adventitious Root. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 61, n. 6, p. 811–817, 2014.

RAJA, M. R. C. et al. Versatile and Synergistic Potential of Eugenol: A Review. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, n. 367, 2015.

- RODRIGUES-BRANDÃO, I. et al. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1893-1898, 2014.
- SANGWAN, N.S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht v. 34, p. 3–21, 2001.
- SANTANAA, A. N. M. et al. Rupture of glandular trichomes in *Ocimum gratissimum* leaves influences the content of essential oil during the drying method. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 524-530, 2014.
- SARROU A. et al. Effect of melatonin, salicylic acid and gibberellic acid on leaf essential oil and other secondary metabolites of bitter orange young seedlings. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 6, p. 487-496, 2015.
- STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Curitiba, v. 10, n. 1, p 18-46, 2011.
- SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, 2012.
- SHIOJIRI, K. et al. Airborne signals of communication in sagebrush: a pharmacological approach. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, n. 12, p. e1095416, 2015.
- SONG, J.; WANG, Z. RNAi-mediated suppression of the phenylalanine ammonia-lyase gene in *Salvia miltiorrhiza* causes abnormal phenotypes and a reduction in rosmarinic acid biosynthesis. **Journal of Plant Research** v. 124, p.183–192, 2011.
- SZYMANOWSKA, U. et al. Anti-inflammatory and antioxidative activity of anthocyanins from purple basil leaves induced by selected abiotic elicitors. **Food Chemistry**, v. 172, p. 71–77, 2015.
- VIEIRA, R. F. et al. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 287-304, 2001.
- VLOT, A. C.; DEMPSEY, D. A. and KLESSIG, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review Phytopathology**, v. 47, p. 177–206, 2009.
- VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, 2010.
- WANG, Z. et al. The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 113–120, 2015.
- Yemm, E.W.; Cocking, E.C. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analytical Chemistry**, v.80, p.209- 213, 1955

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, London, v.57, n.3, p.508-514, 1954.

YIN, J. et al. The response of physiological characteristics, expression of OSC genes, and accumulation of triterpenoids in *Betula platyphylla* Sukto MeJA and SA treatment. **Plant molecular Biology Reporter**, v. 34, n. 2, p. 427-439, 2016.

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

ZŁOTEK, U.; MAJEWSKA, M. M. e SZYMANOWSKA, U. Effect of jasmonic acid elicitation on the yield, chemical composition, and antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oil of lettuce leaf basil (*Ocimum basilicum* L.). **Food Chemistry**, v. 213, p. 1–7, 2016.