



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

MATEUS MODESTO BOSISIO

**COMPOSTOS ELICITORES EM ALECRIM:
EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
SÍNTESE DE ÓLEO ESSENCIAL E ÁCIDO CARNÓSIDICO**

Presidente Prudente - SP
2024

MATEUS MODESTO BOSISIO

**COMPOSTOS ELICITORES EM ALECRIM:
EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
SÍNTESE DE ÓLEO ESSENCIAL E ÁCIDO CARNÓSIDICO**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia P. Santos

615.321
B743c

Bosisio, Mateus Modesto.

Compostos elicitores em alecrim: efeitos sobre a produção de biomassa, atividade antioxidante e síntese de óleo essencial e ácido carnósico / Mateus Modesto Bosisio. –Presidente Prudente, 2024.
55f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2024.

Bibliografia.

Orientador: Ana Cláudia P. Santos

1. Planta Medicinal e Aromática. 2. Ácido salicílico.
3. Extrato de Alga marinha. 4. Produção de terpenos.
Título.

Bibliotecária responsável: Michele Mologni – CRB 8-6204

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "COMPOSTOS ELICITORES EM ALECRIM: EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E SÍNTESE DE ÓLEO ESSENCIAL E ÁCIDO CARNÔSICO"

AUTOR(A): MATEUS MODESTO BOSISIO

ORIENTADOR(A): Dra. ANA CLAUDIA PACHECO SANTOS

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

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Dra. ANA CLAUDIA PACHECO SANTOS

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

Dra. CECI CASTILHO CUSTÓDIO

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

Dr. PEDRO HENRIQUE GORNI

UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / Tupã (SP)

Data da realização: Presidente Prudente, 29 de fevereiro de 2024.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus parceiros e amigos, pais e parentes, mestres e professores, que de forma direta ou indireta foram inspiração para a idealização e realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Virgem Maria e São José.

Aos meus intercessores por todas as orações para o cumprimento deste projeto.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Ana Claudia Pacheco Santos, pelo grande exemplo de profissional, pela transmissão dos conhecimentos e por todos os conselhos.

Ao Centro de Estudos em Ecofisiologia de Plantas do Oeste Paulista (CEVOP - UNOESTE), pelo uso das suas instalações e toda a colaboração dos seus integrantes durante a pesquisa.

Aos integrantes dos variados grupos de pesquisa ligados ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da UNOESTE.

Aos funcionários do Viveiro de Plantas e dos Laboratórios que me auxiliaram nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Cícero Deschamps, da Universidade Federal do Paraná (Curitiba/PR), por viabilizar as análises cromatográficas.

Aos amigos da graduação e da Pós-graduação dos variados cursos que tive o grandioso prazer de prestigiar a companhia.

“O tempo nos faz esquecer o que nos trouxe aqui, mas eu lembro
muito bem como se fosse amanhã.”

(Engenheiros do Hawaii- Armas Químicas e Poemas)

RESUMO

Compostos elicitores em alecrim: efeitos sobre a produção de biomassa, atividade antioxidante, síntese de óleo essencial e ácido carnósico

RESUMO: O alecrim (*Salvia rosmarinus* Spenn.) é uma planta medicinal com ampla utilização na indústria farmacológica, cosmética e alimentícia. Substâncias elicitoras em plantas são compostos que estimulam a produção de metabólitos bioativos e podem adicionalmente estimular o crescimento. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação foliar dos elicitores ácido salicílico (AS) e extrato de alga marinha (EAM) em alecrim. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos [T1 = controle, T2 = AS 1,0 mmol L⁻¹, T3 = AS 2,0 mmol L⁻¹, T4= EAM (*Ascophyllum nodosum* - 6 mL L⁻¹) e T5= EAM (*Solieria chordalis* - 2 mL L⁻¹)] e 10 repetições. As respostas à elicitação foram avaliadas por meio de parâmetros biométricos (altura de plantas, número de ramos, massa fresca e massa seca da parte aérea) e parâmetros bioquímicos (carboidratos totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante). Foram determinados a concentração e o rendimento de óleo essencial (OE), com identificação dos compostos presentes no mesmo; bem como as concentrações foliares de antioxidantes (ácidos carnósico e carnosol). Não houve diferença entre os tratamentos sobre o crescimento de biomassa, com exceção do número de ramos que foi menor nas plantas tratadas com AS 1,0 mmol L⁻¹ e *S. chordalis*. A concentração de polifenóis totais e a atividade antioxidante por DPPH não se alteraram em relação ao controle. Os tratamentos com AS 1,0 mmol L⁻¹ e *S. chordalis* resultaram em aumentos de 46,04% e 35,7% na concentração de OE, respectivamente. Os componentes majoritários do OE não foram alterados pela elicitação. Em relação à concentração de ácido carnósico, verificou-se aumento de 49,87% no tempo de 24 horas após a aplicação em plantas tratadas com AS 2,0 mmol L⁻¹. Após 48 horas da última aplicação dos elicitores, não houve diferença entre os tratamentos. A concentração de carnosol apresentou aumentos de 28,1% nas plantas tratadas com *A. nodosum* (24 horas após a aplicação dos elicitores), e de 27,2% e 23,85% nas plantas tratadas com *A. nodosum* e *S. chordalis* (48 horas após a aplicação dos elicitores respectivamente). Esses resultados indicam que a elicitação das plantas de *S. rosmarinus* com AS e EAM não alterou a biomassa

fresca e seca das plantas, promoveu aumentos expressivos na biossíntese de óleo essencial e estimulou a oxidação do ácido carnósico em seu derivado, carnosol.

Palavras-chave: planta medicinal e aromática; ácido salicílico; extrato de alga marinha; produção de terpenos.

ABSTRACT

Elicitory compounds in rosemary: effects on biomass production, antioxidant activity and essential oil and carnosic acid synthesis

ABSTRACT: Rosemary (*Salvia rosmarinus* Spenn.) is a medicinal plant with wide use in the pharmacological, cosmetic and food industries. Elicitor substances in plants are compounds that stimulate the production of bioactive metabolites and can additionally stimulate growth. The objective of this study was to evaluate the effect of foliar application of the elicitors salicylic acid (SA) and seaweed extract (SE) on rosemary. The experiment was conducted in a greenhouse, with a completely randomized design, consisting of five treatments [T1 = control, T2 = SA 1.0 mmol L⁻¹, T3 = SA 2.0 mmol L⁻¹, T4 = SE (*Ascophyllum nodosum* – 6 mL L⁻¹) and T5 = SE (*Solieria chordalis* – 2 mL L⁻¹)] and 10 replications. Responses to elicitation were evaluated using biometric parameters (plant height, number of branches, fresh mass and dry mass of shoots) and biochemical parameters (total carbohydrates, total phenolic compounds and antioxidant activity via DPPH). The concentration and yield of essential oil (EO) were determined, with identification of the compounds present in it; as well as foliar concentrations of antioxidants (carnosic acids and carnosol). There was no difference between treatments on biomass growth, with the exception of the number of branches, which was lower in plants treated with 1.0 mM AS and *S. chordalis*. The concentration of total polyphenols and antioxidant activity by DPPH did not change in relation to the control. Treatments with AS 1mM and *S. chordalis* resulted in increases of 46.04% and 35.7%, under OE respectively. The majority components in the OE were not changed by elicitation. Regarding the concentration of carnosic acid, there was an increase of 49.87% within 24 hours after application of plants treated with 2.0mM SA. 48 hours after the last application of the elicitors, there was no difference between the treatments. The carnosol concentration increased by 28.1% in plants treated with *A. nodosum* (24 hours after application of the elicitors), and by 27.2% and 23.85% in plants treated with *A. nodosum* and *S. chordalis* (48 hours after application of the elicitors). These results indicate that the elicitation of *S. rosmarinus* plants with AS and SE did not change the fresh and dry mass of the plants, promoted significant increases in essential oil biosynthesis and stimulated the oxidation of carnosic acid to its derivative, carnosol.

Keywords: medicinal and aromatic plant; salicylic acid; seaweed extract; production of terpenes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática das duas vias metabólicas para a biossíntese de terpenos em plantas (HMG-CoA= 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase, C= número de carbonos, IPP = isopentenilpirofosfato, GPP = geranyl pirofosfato, FPP = farnesil pirofosfato, GGPP = geranylgeranyl pirofosfato)..... 20
- Figura 2.** Altura de plantas (A), número de ramos (B), massa fresca da parte aérea (C) e massa seca da parte aérea (D) em plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle, T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹, T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹, T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 36
- Figura 3.** Concentração e rendimento de óleo essencial (OE) em plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 38
- Figura 4.** Concentração foliar de polifenóis totais em plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 39
- Figura 5.** Atividade antioxidante por DPPH em plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 40
- Figura 6.** Concentração de carboidratos solúveis totais em folhas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)..... 41
- Figura 7.** Cromatograma do óleo essencial de plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação, evidenciando os compostos majoritários α -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, 1,8 cineol e canfora..... 44
- Figura 8.** Concentração foliar de ácido carnósico em folhas de *Salvia rosmarinus* nos tempos 0, 24 e 48 horas após a última aplicação dos elicitores e após a colheita das plantas (cht). (T1 = controle; T2 = Ácido

Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum* 46
nodosum 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na
coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).....

Figura 9. Concentração foliar de carnosol em plantas de *Salvia rosmarinus* 48
nos tempos 0, 24 e 48 horas após a última aplicação e após a colheita (cht),
dos tratamentos elicitores elicitação (T1 = controle, T2 = Ácido Salicílico
1,0mM, T3 = Ácido Salicílico 2,0mM, T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e
T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam
diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Temperatura média, temperatura máxima e temperatura mínima mensais durante o período experimental (novembro de 2022 a junho de 2023), em Presidente Prudente-SP.....	29
Tabela 2. Composição química do óleo essencial em plantas de <i>Salvia rosmarinus</i> submetidas a tratamentos de elicitação (T1 = controle, T2 = AS 1,0mM, T3 = AS 2,0mM, T4= <i>Ascophyllum nodosum</i> e T5= <i>Solieria chordalis</i>).....	43
Tabela 3. Proporções relativas (%) dos componentes majoritários (α -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, 1,8-cineol e canfora) presentes no óleo essencial de plantas de <i>Salvia rosmarinus</i> em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L ⁻¹ ; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L ⁻¹ ; T4= <i>Ascophyllum nodosum</i> 0,6 mL L ⁻¹ e T5= <i>Solieria chordalis</i> 0,2 mL L ⁻¹).....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Alecrim (<i>Salvia rosmarinus</i> Spenn.)	16
2.1.1	Ácido Carnósico	17
2.2	Elicitação em plantas	19
2.3	Ácido salicílico e extrato de alga marinha como substâncias elicitoras ..	21
3	HIPÓTESE	26
4	OBJETIVO	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	Avaliações biométricas.....	29
5.2	Análises bioquímicas.....	30
5.3	Quantidade e qualidade do óleo essencial	31
5.4	Análise estatística	33
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O alecrim (*Salvia rosmarinus* Spenn.) é uma planta medicinal originária do Mediterrâneo e cultivada no Brasil por pequenos produtores organizados em cooperativas/associações ou em parceria com empresas que comercializam extratos de plantas ou óleos essenciais. Além do óleo essencial empregado nas indústrias cosmética e medicinal, o alecrim apresenta também compostos com atividade antioxidante utilizados na indústria alimentícia, destacando-se o ácido rosmarínico, o ácido carnósico e seu derivado carnosol. Tais substâncias também apresentam outras atividades biológicas, sendo empregadas nas indústrias cosmética e farmacêutica. Essa ampla possibilidade de comercialização torna o alecrim uma planta industrial com crescente demanda nos mercados interno e externo.

No entanto, as cultivares de alecrim utilizadas no Brasil são exóticas, tendo sido adaptadas às condições brasileiras e a tecnologia de produção carece de informações agronômicas que forneçam subsídios para o correto manejo da cultura.

Somado a isso, a composição química (quimiotipo), da planta sofre variação em função da sazonalidade e fatores edafoclimáticos, que alteram a relação de óleos essenciais e características morfológicas dependendo de sua origem geográfica. Tais aspectos geram heterogeneidade nos ciclos produtivos e limitam tanto a previsibilidade de produção como também os ganhos de produtividade.

Como não existem programas de melhoramento genético no Brasil que busquem incrementar a produção de compostos bioativos em plantas medicinais, uma das formas mais rápidas de superar esses entraves é por meio da técnica de elicitação. Essa tecnologia é capaz de direcionar o metabolismo da planta para rotas biossintéticas específicas, resultando em maiores concentrações de compostos de interesse comercial. Os elicitores são substâncias naturais ou sintéticas que podem ser aplicadas tanto em culturas de células como em plantas intactas, sendo que os resultados da elicitação são diferentes entre as espécies de plantas e os tipos de elicitores utilizados.

Os poucos estudos sobre elicitação na espécie *S. rosmarinus* realizados até o momento apresentaram resultados positivos de aumento de rendimento de óleo essencial na planta e alterações na qualidade do óleo. Porém pouco é conhecido sobre o efeito dos elicitores na produção dos compostos antioxidantes do alecrim (ácido carnósico e carnosol). Para validar a utilização desta técnica no manejo

produtivo da cultura existe a necessidade de se testar diferentes compostos elicitores, as concentrações a serem aplicadas e a frequência de aplicação, além de se avaliar o efeito da elicitação sobre as outras classes de compostos presentes na espécie.

Neste contexto, foram avaliados neste estudo os efeitos do ácido salicílico (um elicitor abiótico de natureza hormonal) e do extrato de alga marinha (um elicitor de origem biológica) sobre a produção de biomassa e de compostos ativos em *S. rosmarinus*. Estes dois elicitores vem sendo amplamente estudados em espécies aromáticas e medicinais e apresentam a vantagem adicional de serem compostos de uso permitido em sistemas orgânicos de produção, colaborando para a produção agrícola sustentável.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alecrim (*Salvia rosmarinus* Spenn.)

A planta de alecrim é uma importante fonte de metabólitos secundários que possuem benefícios relevantes tanto na nutrição, saúde humana, quanto para a sustentabilidade.

Pertencente à família Lamiaceae, esta espécie é um arbusto perene, nativo da região mediterrânea da Europa, que atinge até 1,5 m de altura. O nome mais utilizado para a espécie, *Rosmarinus officinalis* L., é considerado uma sinonímia do nome atual, pois investigações moleculares evidenciaram que *R. officinalis* é encaixado no gênero *Salvia* (Drew *et al.*, 2017). O alecrim é listado nas farmacopeias oficiais de vários países, apresentando propriedades digestivas, estimulantes, antiespasmódicas e emenagogas (Lorenzi; Mattos, 2008). Seus metabólitos possibilitam o alecrim a tolerância às condições adversas de solo, na descontaminação de metais pesados, sem que ocorram menor desempenho em produtividade, atuando como fitorremediador de solos (Anand *et al.*, 2021).

Os compostos secundários bioativos presentes nas folhas do alecrim são o óleo essencial e compostos fenólicos como o ácido rosmarínico e o ácido carnósico.

O alecrim possui crescimento lento, sendo colhido a partir de 4 a 6 meses após o plantio, para que se tenha maior volume de biomassa e rendimento de óleo essencial (g planta⁻¹). O intervalo entre cortes também deve ser longo para permitir a rebrota da planta, porém a concentração de óleo (%) não é influenciado por este fator (May *et al.*, 2010). Por esta particularidade, associada à alta demanda, o óleo de alecrim possui custo elevado, sendo comercializado em média a R\$500,00 o litro (Haje Insumos Orgânicos, 2020).

O rendimento do óleo essencial de alecrim gira em torno de 0,5 a 2,5%, variando em função do cultivar, país de origem do cultivar, condições climáticas durante o cultivo, idade da planta e manejo da cultura (Ribeiro *et al.*, 2018); bem como das condições de extração e armazenamento do óleo essencial. Os monoterpenos são os constituintes majoritários presentes no óleo essencial, sendo que os principais compostos encontrados são o 1,8-cineol, α -pineno, β -pineno, β -mirceno, cânfora e verbenona (Boix *et al.*, 2010; May *et al.*, 2010).

Além do óleo essencial, o alecrim possui em suas folhas uma grande variedade de moléculas bioativas com potencial terapêutico, normalmente, os compostos bioativos presentes no alecrim são quantificados em duas frações distintas: volátil e não volátil. A primeira compreende o óleo essencial, composto principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos como cânfora, borneol, linalol e humuleno. A fração não-volátil compreende compostos menos hidrofóbicos, como os ácidos fenólicos, os flavonoides e terpenos fenólicos, principalmente diterpenóides (C20) (Pizani *et al.*, 2022).

Desta maneira, após a extração do óleo essencial nas destilarias, a massa foliar resultante da destilação ainda possui uma série de compostos bioativos os quais são extraídos por diferentes técnicas produzindo-se os extratos de alecrim que são comercializados na forma de pó seco para as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. As concentrações de ácido carnósico, carnosol e ácido rosmarínico, dentre outros, presente nos extratos comercializados de alecrim pode variar de 10 a 95%. Quanto maior a concentração, maior será o valor de comercialização do extrato e extratos com maiores concentrações são altamente atrativos, pois podem ser usados em menor quantidade para a obtenção dos efeitos desejados. Porém, as técnicas utilizadas na obtenção do extrato afetam diretamente a concentração destes compostos e extratos mais concentrados são obtidos por técnicas mais complexas e de maior custo (Pizani *et al.*, 2022).

2.1.1 Ácido Carnósico

O ácido carnósico (AC) é um diterpeno fenólico encontrado somente em algumas espécies de plantas, todas elas exclusivas da família Lamiaceae. Entretanto, dentre as lamiáceas, o alecrim é a espécie que possui a maior concentração de ácido carnósico (aproximadamente 4 a 10% do peso seco da folha). Apesar do grande interesse industrial no ácido carnósico, existem poucos estudos sobre a sua via biossintética no alecrim. O ácido carnósico pertence à classe de diterpenóides relacionada ao labdano, os quais tem um grupo funcional fenólico. Devido à presença do grupo fenólico, este composto foi geralmente classificado entre os polifenóis. Porém, sua distribuição celular, via biossintética, solubilidade e funções diferem substancialmente da maioria dos compostos fenólicos e se assemelha mais aos terpenos (Birtic *et al.*, 2015).

Hipoteticamente, propõe-se que a biossíntese de AC é iniciada por uma sequência de reações de ciclização (Birtic *et al.*, 2015). A reação inicial converte o precursor diterpeno geranylgeranyl difosfato (GGDP) em difosfato de copalil bicíclico (CDP). Esta protonação iniciada pela reação de ciclização é catalisada por diterpeno sintases de classe II (diTPSs de classe II), denominadas copalil difosfato sintases (CPS), que formam vários estereoisômeros de CDP. Produtos de diterpeno sintases de classe II são posteriormente usados por diterpeno sintases específicas de classe I (diTPSs de classe I) para formar compostos policíclicos específicos. Após a formação do esqueleto parental pelas diterpeno sintases, o citocromo P450 monooxigenase catalisa transformações secundárias dos recém-formados diterpenos policíclicos (Peters, 2010).

As diterpeno sintases estão localizadas nos plastídios, assim os diterpenóides vegetais normalmente se originam da via do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos plastídeos e também é chamada de via do DXP. Porém a via citosólica do mevalonato (MVA) também pode contribuir para a biossíntese do AC (Figura 1), pois alguns estudos demonstram a existência de cruzamentos entre as duas vias (Bick e Lange, 2003; Yang *et al.*, 2012).

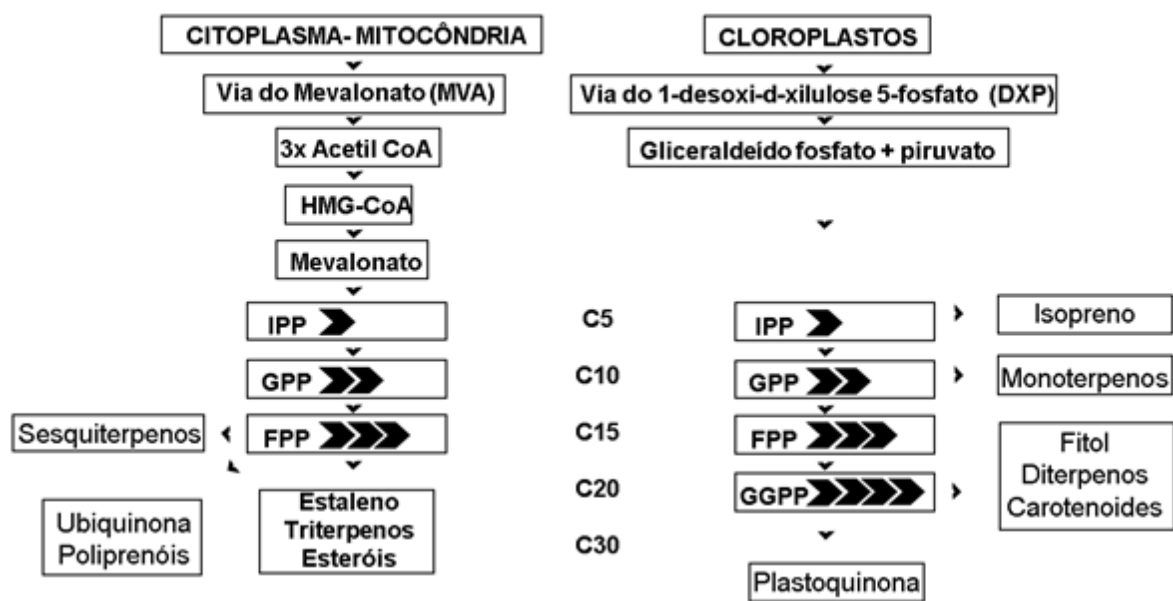


Figura 1. Representação esquemática das duas vias metabólicas para a biossíntese de terpenos em plantas (HMG-CoA= 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase, C= número de carbonos, IPP = isopentenilpirofosfato, GPP = geranyl pirofosfato, FPP = farnesil pirofosfato, GGPP = geranylgeranyl pirofosfato) (Baseado em Felipe ; Bicas, 2017).

O ácido carnósico é bastante instável e sua degradação leva à formação de carnosol (metil éster do ácido carnósico), composto este que juntamente com o ácido carnósico, é responsável por mais de 90% da atividade antioxidante do alecrim (Del Ré e Jorge, 2012). Durante o metabolismo oxidativo do ácido carnósico, este é convertido primeiramente em ácido 6,7 – dehidrocarnósico, o qual por sua vez é transformado quase que imediatamente em outros dois compostos: ácido 7-ketocarnosico e, principalmente, carnosol. Por esta razão, o carnosol é o principal diterpeno fenólico presente nos extratos de alecrim (Del Baño *et al.*, 2003).

2.2 Elicitação em plantas

A elicitação tem sido considerada uma estratégia adequada para melhorar o crescimento e as respostas de defesa do vegetal através da indução das rotas do metabolismo secundário, desta forma aumentando os conteúdos de compostos bioativos nas células, tecidos e órgãos da planta (Murthy; Lee; Paek, 2014). No caso

específico de plantas medicinais, a elicitação é um método empregado para aumentar a biossíntese e o acúmulo de metabólitos secundários de importância farmacêutica (Hao *et al.*, 2015); técnica essa que vem sendo amplamente estudada e utilizada. Como vantagem adicional, a elicitação também pode exercer efeitos positivos sobre o crescimento da planta, a produtividade e a tolerância ao estresse, sendo que em muitos casos os elicitores são denominados de bioestimulantes (Rafiee *et al.*, 2016; Mustafavi *et al.*, 2018).

Os elicitores são definidos como substâncias naturais ou sintéticas que, quando aplicadas em plantas em pequenas concentrações, iniciam ou aumentam a síntese de compostos específicos e podem desempenhar papel relevante no aprimoramento das vias biossintéticas de produção de compostos bioativos comercialmente importantes (Sarmadi *et al.*, 2018). Elicitores naturais são as substâncias de origem biológica, incluindo polissacarídeos originados da parede vegetal (quitina, pectina, celulose, etc.) e microrganismos. Elicitores sintéticos consistem nas substâncias de origem não biológica e são agrupados como elicitores físicos, químicos e hormonais (Naik; Al-Khayri, 2016). A percepção de um elicitor pelo seu receptor geralmente ocorre por meio de eventos em série, tais como: a despolarização da membrana plasmática, a fosforilação e desfosforilação de proteínas citosólicas, a alteração de fluxos iônicos, ativação de proteínas quinase, alcalinização extracelular e a acidificação citoplasmática e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Rafiee *et al.*, 2016). Esses eventos ocorrem entre os primeiros minutos e poucas horas após a percepção do indutor e medeiam a ativação subsequente das respostas em série que culminam com a expressão gênica (Ribeiro, 2018).

As interações entre elicitores e genes precursores das vias biossintéticas do metabolismo secundário de plantas ainda é uma área de estudo pouco explorada e próspera para pesquisas atuais e futuras. Estudos moleculares são necessários para elucidar quais são os genes específicos responsivos à elicitação, principalmente porque no caso do metabolismo secundário vegetal é comum que uma mesma substância seja produzida por vias metabólicas diferentes. A elicitação pode desencadear alterações na expressão dos genes codificadores de enzimas associadas às vias biossintéticas secundárias, podendo ser aplicada tanto em culturas de células vegetais (Naik; Al-Khayri, 2016; Sarmadi *et al.*, 2018; Trettel *et al.*, 2018) como também em plantas intactas (Pérez *et al.*, 2014; Gorni *et al.*, 2020 e

2021). Neste último caso, os elicitores são primeiramente testados em condições controladas para seleção dos elicitores mais promissores, os quais são posteriormente testados em condições mais realistas à campo.

As respostas à elicitação variam entre as espécies de planta e os tipos de elicitores, os quais podem ter efeitos diferentes sobre uma mesma espécie (Rodrigues-Brandão *et al.*, 2014). Desta maneira, dentre os vários elicitores, é importante considerar a concentração, o número de aplicações, o tempo de elicitação e o estágio de crescimento da cultura no momento do estímulo. O conhecimento detalhado destes fatores é imprescindível para se obter os resultados positivos desta técnica na produção vegetal.

2.3 Ácido salicílico e extrato de alga marinha como substâncias elicitoras

O ácido salicílico (AS) é um hormônio vegetal de natureza fenólica, o qual atua em diferentes processos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Além de seu efeito hormonal, o AS está relacionado com a sinalização de defesa da planta contra estresses bióticos e abióticos (Venegas -Molina *et al.*, 2020) e por este motivo, a aplicação exógena de AS em espécies cultivadas apresenta comprovada ação de atenuação e/ou indução de tolerância para diferentes tipos de condições estressantes como seca (Okuma *et al.*, 2014), baixa temperatura (Muthu *et al.*, 2016), salinidade (Silva *et al.*, 2014) e metais pesados (Mei *et al.*, 2015).

No caso específico das plantas medicinais, por tratar-se de uma substância reconhecidamente segura ao ser humano e ao ambiente, o AS vem sendo bastante estudado como um potente elicitor abiótico. A aplicação de AS (concentrações de 0,5 a 2 mmol L⁻¹) resultou em aumentos de compostos secundários de interesse comercial em *Mentha piperita* L. (Pérez *et al.*, 2014), *Ocimum basilicum* L. (MIRZAJANI *et al.*, 2015), *Melissa officinalis* L. (Pirbalouti *et al.*, 2019) e *Achillea millefolium* L. (Gorni *et al.*, 2020, 2021).

Para espécies pertencentes a família Lamiaceae como *Salvia coccínea*, a aplicação de AS com a interação do estresse salino proporcionou aumento do número de ramos, massa fresca, e concentração total de clorofila. Sob a condição de 100 mmol L⁻¹ de NaCl as pulverizações de AS (0,5 e 1,0 mmol L⁻¹), proporcionaram maior conteúdo fenólico total e atividade antioxidante foliar por

FRAP e ABTS, resultados que corroboram para indução da atividade de enzimas antioxidantes atenuando o efeito de espécies reativas de oxigênio (Grzeszczuk; Salachna; Meller; 2018).

A aplicação de AS em plantas de salvia-comum (*Salvia officinalis* L), em doses de 0,5 mmol L⁻¹ aumentaram o crescimento fisiológico de plantas cultivadas sob condição normais. Quando sob estresse por altas concentrações de zinco (40 mmol L⁻¹ de ZnSO₄), a elicitação com AS de 0,5 mmol L⁻¹ em *S. officinalis*, resultou em fitorremediação aos efeitos negativos do elemento, uma vez que houve diminuição do acúmulo de Zn, aumento nas concentrações de nutrientes, índice de clorofila e acúmulo de óleo essencial em relação ao controle (Es-Sbihi; Hazzoumi Amrani Joutel; 2020).

No alecrim cultivado a campo, a aplicação exógena de AS (1 e 2 mmol L⁻¹) induziu aumentos na produção de folhas, raízes, óleo essencial e em alguns componentes do óleo essencial, tanto em plantas controle como nas plantas sob estresse hídrico (Abbaszadeh *et al.*, 2020).

Atualmente, é crescente o uso de produtos comerciais à base de extrato de algas marinhas (EAM), inclusive na agricultura orgânica, permitindo ganhos de produtividade de forma sustentável (Ali *et al.*, 2021, Van Oosten *et al.*, 2017). Ao contrário dos fertilizantes químicos, extratos derivados de algas são biodegradáveis, não-tóxicos, não-poluente e não perigosos para os seres humanos e animais (Rathore *et al.*, 2009).

Solieria chordalis (C. Agardh) é uma espécie de alga vermelha invasora, encontrada principalmente na região da Bretanha, possui atividades antioxidante, inibitória e polissacarídeos bioativos diversos potencialmente utilizáveis como matéria-prima para componentes biotecnológicos nas áreas industriais farmacêutica e agrícola (Kendel *et al.*, 2015; Suwal *et al.*, 2019; Hardouin *et al.*, 2014). A espécie *S. chordalis* contém 25,5 % de cinzas; 22,1 % de proteínas; 39,7% de açúcares neutros; 8,8% de grupos fosfato; 3,1% de nitrogênio total; 1,8% de ácidos urônicos, 0,9 % de lipídeos e 0,9% de polifenóis totais na massa seca do organismo (Suwal *et al.*, 2019).

A espécie *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis é a alga marinha mais pesquisada na agricultura (Saeger *et al.*, 2019; Mukherjee; Patel, 2020), sendo explorada comercialmente em uma ampla gama de produtos comercializados como bioestimulantes na agricultura. Especificações físicas e químicas do extrato líquido

comercial de *A. nodosum*, de acordo com o rótulo do Acadian® Marine plant extract (Acadian Agritech) indicam a presença de matéria orgânica (13,00% - 16,00%); Nitrogênio total (N): 0,30% - 0,60%; Fosfato disponível: (P_2O_5) < 0,1%; Potássio solúvel: (K_2O) 5,00% - 7,00%; Enxofre: (S) 0,30% - 0,60%; Magnésio: (Mg) 0,05% - 0,10%; Cálcio: (Ca) 0,10% - 0,20%; Sódio: (Na) 1,00% - 1,50%; Ferro: (Fe) 30 - 80 ppm; Cobre: (Cu) 01 - 05 ppm; Zinco: (Zn) 05 - 15 ppm; Manganês: (Mn) 01 - 05 ppm; Boro: (B) 20 - 50 ppm; Carboidratos: Ácido algínico, manitol, laminarina Aminoácidos (1,01%); Alanina: 0,08%; Ácido aspártico: 0,14%; Ácido glutâmico: 0,20%; Glicina: 0,06%; Isoleucina: 0,07%; Leucina: 0,09%; Lisina: 0,05%; Metionina: 0,03%; Fenilalanina: 0,07%; Prolina: 0,07%; Tirosina: 0,06%; Valina: 0,07%; Triptofano: 0,02% (Carvalho, 2013).

A ação combinada das diferentes moléculas orgânicas e nutrientes presentes nas algas marinhas produz amplo efeito nas culturas agrícolas, tanto estimulatório (resultando em aumento de crescimento e parâmetros de produção) como também elicitador (atuando sobre as respostas de defesa da planta, tornando-a mais tolerante aos estresses bióticos e abióticos) (Ali *et al.*, 2021). As algas marinhas possuem nutrientes minerais, aminoácidos, hormônios vegetais e polissacarídeos que não são encontrados em plantas terrestres (carragenanas, laminarina, fucoidanas e alginatos (Khan *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014; Yakhin *et al.*, 2017). Os componentes majoritários presentes em EAM são os polissacarídeos (76% do peso seco). Os EAM também contêm compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonas, ácido cinâmico, ácido benzoico, quercetina e lignina. Estes múltiplos componentes orgânicos atuam em sinergismo na regulação da expressão gênica relacionada à defesa e na interação com fitohormônios, regulando o crescimento da planta. Cada componente específico pode atuar em várias vias metabólicas de forma independente ou interativamente (Ali *et al.*, 2021).

A ligação entre os componentes presentes nos EAM e receptores de membrana e leva à ativação de mensageiros secundários e uma miríade de eventos de sinalização celular que ocorrem em sequência, resultando na regulação de fatores de transcrição e genes de defesa. Estes fatores de transcrição estão envolvidos com a sinalização hormonal (auxinas, citocininas e giberelinas), que por sua vez regula genes relacionados à assimilação de C e N, metabolismo de lipídeos e carboidratos, transportadores de nutrientes e fotossíntese. Os fatores de transcrição também estão envolvidos com a sinalização de ácido abscísico (ABA),

etileno, ácido salicílico e ácido jasmônico, regulando a expressão gênica de defesa contra estresses bióticos e abióticos (Ali *et al.*, 2021).

A aplicação foliar de EAM em interação com micronutrientes pode promover efeitos positivos sobre o crescimento vegetativo, rendimento e produção em plantas medicinais economicamente importantes. Em *Artemisia annua* L., a combinação com maior influência sobre os parâmetros analisados foi de 4 mL L⁻¹ de EAM e 150 ppm Fe + Mn + Zn, quando se obteve a maior concentração do composto farmacológico de metabolismo secundário denominado artemisinina. Além disso, houve incremento na concentração de óleo essencial e na sua qualidade (Ghatas *et al.*, 2021).

A aplicação de extratos de alga marinha induz resultados favoráveis na mitigação de estresses abióticos em plantas de tomate. *A. nodosum* demonstrou capacidade de melhorar absorção de água e nutrientes, a germinação e o vigor, o acréscimo da concentração de clorofila (índice SPAD), maior produção e qualidade de frutos e longevidade pós colheita. As plantas ainda apresentaram maior resistência aos patógenos Verticillium-murcha (*Verticillium dahliae* Kleb.), pinta-preta (*Alternaria solani* Sorauer.), galha-da-coroa (*Agrobacterium tumefaciens*) e mancha-bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) (ALI *et al.*, 2021; Mukherjee E Patel., 2020).

O efeito da fertilização orgânica com extrato de algas (gêneros *Ascophylum*, *Sargassum* e *Laminaria*) via solo e via pulverização foliar em plantas de alecrim, resultou em plantas pulverizadas com EAM com maior área foliar e concentrações de óleo essencial do que as plantas fertilizadas de forma inorgânica (solução nutritiva) ou não fertilizadas, independentemente do método de aplicação. Determinados componentes majoritários do óleo essencial também foram aumentados pela fertilização com EAM, sendo que os autores atribuíram essa variação positiva na composição do óleo ao melhor desempenho fotossintético da planta. (Tawfeeq *et al.*, 2016).

O cultivo em campo de alecrim também se obteve resultados positivos da aplicação foliar de diferentes concentrações de EAM, quitosana e silicato de potássio sobre o crescimento, parâmetros bioquímicos e a produção de óleo essencial. Os diferentes elicitores resultaram em aumentos na altura de plantas, número de ramos e massa fresca e seca da planta, com aumentos concomitantes na concentração de pigmentos fotossintéticos, carboidratos, macronutrientes (N, P e K) e na

concentração de óleo essencial. O tratamento mais eficaz consistiu na aplicação conjunta de EAM (6 mL L^{-1}) e chitosana (6 mL L^{-1}) em 3 pulverizações subsequentes (Waly *et al.*, 2019).

3 HIPÓTESE

Neste estudo foi considerada a hipótese de que os elicitores AS e EAM poderiam alterar o metabolismo secundário na espécie *S. rosmarinus*, resultando em plantas com maiores concentrações foliares de ácido carnósico e óleo essencial, desde que ambos os compostos são terpenos produzidos pelas mesmas vias metabólicas (vias MVA e MEP).

4 OBJETIVO

O objetivo foi avaliar o potencial elicitor dos compostos AS e EAM sobre a produção de biomassa, a atividade antioxidante e as concentrações foliares de compostos secundários bioativos em plantas de alecrim.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação e no CEVOP, na Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, em Presidente Prudente - SP. As mudas de alecrim (*Salvia rosmarinus* Spenn.) foram obtidas junto ao banco de germoplasma de Plantas Aromáticas e Medicinais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). As mudas foram mantidas em viveiro telado para crescimento até o momento da instalação do experimento. As condições meteorológicas durante o período experimental são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Temperatura média, temperatura máxima e temperatura mínima mensais durante o período experimental (novembro de 2022 a junho de 2023), em Presidente Prudente-SP. (UNOESTE CLIMA, 2023).

MÊS	Temp. Média °C	Temp. Máx °C	Temp. Mín °C
Nov	25,6	32,2	19,5
Dez	25,3	31,0	21,1
Jan	25,0	30,5	21,4
Fev	24,6	29,8	21,4
Mar	25,6	31,3	21,7
Abr	23,5	28,9	19,2
Mai	21,7	27,8	16,7
Jun	19,4	25,2	14,6

Para homogeneização do material, as mudas foram selecionadas quanto à altura (em torno de 15 cm). O plantio foi realizado em vasos plásticos com capacidade para 9 litros, preenchidos com uma mistura de areia e terra vegetal comercial – Bioterra ® (proporção 1:1), a qual apresentava as seguintes características químicas (RAIJ et al., 2001): matéria orgânica, 68,5 g dm⁻³; pH (1:2,5 solo/suspensão de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹), 6,2; P (resina), 305 mg dm⁻³; K, Ca e Mg trocáveis de 10,6, 193 e 45,8 mmol_c dm⁻³, respectivamente, acidez total em pH 7,0 (H+Al) de 17,2 mmol_c dm⁻³, capacidade de troca de cátions total (CTC) de 267,5 mmol_c dm⁻³ e saturação por bases de 93%. A irrigação automática dos vasos foi realizada por gotejamento, uma vez ao dia, procurando-se manter o substrato com

umidade próxima à da capacidade de campo. O delineamento adotado foi inteiramente casualizados, composto por 5 tratamentos e dez repetições, sendo considerado como repetição uma planta por vaso.

Os tratamentos foram aplicados por meio da pulverização foliar, a saber:

T1 - Controle (pulverização com água destilada)

T2 - Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹

T3 - Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹

T4 - Extrato de alga marinha (*Ascophyllum nodosum*) 6 mL L⁻¹

T5 - Extrato de alga marinha (*Solieria chordalis*) 2 mL L⁻¹

No preparo das soluções foram utilizados AS em pó (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), produto comercial Acadian® (Acadian Seaplants, Darmouth, Canadá) para a alga *A. nosodum* e o produto comercial Seamel Pure® (Olmix Group, Bréhan, França) para a alga *S. chordalis*.

Foram efetuadas 5 pulverizações sequenciais de cada elicitor, com intervalos de 15 dias, iniciando-se a partir dos 50 dias após o transplântio das mudas para os vasos. O volume de solução aplicado por planta foi estimado a partir do ponto de gotejamento (45 ml por planta), utilizando-se pulverizador manual pressurizado. Adicionou-se 50 µL L⁻¹ de espelhante adesivo (Agral®) nos tratamentos com AS e EAM.

A colheita das plantas ocorreu aos 155 dias após o transplântio. Foram retiradas amostras foliares da porção apical de ramos localizados no terço superior das plantas, as quais foram imediatamente armazenadas em ultra freezer para as análises bioquímicas posteriores.

5.1 Avaliações biométricas

O crescimento das plantas foi quantificado por medições de altura, número de ramos e massas fresca e seca da parte aérea (folhas + ramos), realizadas em todas as plantas no momento da colheita. As plantas foram secas em estufa com circulação de ar à 40 °C para a determinação da massa seca da parte aérea.

5.2 Análises bioquímicas

a) Preparo dos extratos para as análises de polifenóis totais e atividade antioxidante:

O extrato foi obtido através da metodologia de Honorato (2023), onde as folhas frescas foram maceradas em N líquido. Foram pesados 50 mg de folha macerada, adicionando-se 1 mL de etanol 80% e levando-se ao sonificador por duas sessões de 15 min a 50 hertz. O material foi levado a centrifugação a 6000 rpm por 10 min e armazenado a -4 °C.

b) Concentração de compostos fenólicos totais na folha:

A determinação da concentração de fenólicos totais foi realizada pelo método proposto por Stagos et al. (2012), empregando o reagente de Folin-Ciocalteu. Para a construção da curva padrão ($y = 0,0534x - 0,0549$; $R^2 = 0,9709$), utilizou-se ácido gálico os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama da amostra fresca (mg EAG g⁻¹). A análise foi realizada em triplicata.

c) Atividade antioxidante via sequestro dos radicais livres DPPH:

A determinação da atividade antioxidante foi baseada na medida da extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) por método espectrofotométrico (BLOIS et al., 1958). A análise foi realizada em triplicata.

O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da percentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a Equação:

$$\%AA = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}} / A_{\text{controle}}) \times 100$$

Onde, A_{controle} é a absorbância do DPPH e A_{amostra} é a absorbância da amostra após 30 minutos.

e) Concentração de carboidratos solúveis totais nas folhas:

A concentração de carboidratos solúveis totais nas folhas frescas (mg g⁻¹) foi analisada pela extração com fenol e ácido sulfúrico, conforme a metodologia proposta por Dubois *et al.* (1956), baseando-se em curva padrão de glicose ($y = 0,069x + 0,0322$ $R^2 = 0,9527$).

f) Concentrações foliares de ácido carnósico e carnosol:

As amostras foliares foram coletadas em três momentos distintos após a última aplicação dos elicitores, procurando-se garantir o efeito elicitor acumulado. A primeira coleta foi realizada 24 horas antes da quinta aplicação foliar dos elicitores, (tempo 0h). A segunda coleta foi realizada 24 horas após a quinta aplicação foliar dos elicitores (tempo 24 horas). A terceira coleta foi realizada 48 horas após a quinta aplicação foliar (tempo 48 h).

Para o preparo do extrato foliar, 1000 mg de folhas frescas de cada amostra foram previamente pulverizadas em N líquido e em seguida adicionou-se 10 mL de etanol 80% (etanol absoluto + água ultrapura). A solução foi homogeneizada em agitador vórtex por 30s e levada a banho maria a 35 °C por 3 horas, homogeneizando a solução em intervalos de 1 hora. Após a extração a solução foi filtrada em papel filtro. Antes da análise cromatográfica a solução foi também filtrada em filtro de 22 µm.

As concentrações de ácido carnósico e carnosol foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu® (UFLC) controlado pelo software LC solution e equipado com um injetor automático e detector UV (SPD-20A). Na separação dos compostos foi utilizada uma coluna C18 Shim-Pack CLC ODS (M) (250 x 4.6 mm, tamanho da partícula = 5 µm), protegida por uma pré-coluna Shim-Pack CLC G-ODS (100 x 4.0 mm) ambas Shimadzu (Kyoto, Japan). Vinte microlitros do extrato de cada amostra foram injetados. A separação dos compostos presentes nos extratos foi conduzida com um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. A fase móvel consistiu de um gradiente de eluição do solvente A (840 mL de água ultrapura + 10 mL de ácido acético + 150 mL de acetonitrila) e solvente B (Metanol). O programa de gradiente de eluição foi: 0 - 30 min (10-100 % B), 30-35 min (100 % B), 35-37min (100 - 10 % B) e 37-40min (10 % B). Os compostos foram detectados pelo detector UV a 284 nm. A identificação e quantificação do ácido carnósico e carnosol foi realizada utilizando uma curva analítica de padrões Sigma.

5.3 Quantidade e qualidade do óleo essencial

a) Obtenção do óleo essencial:

A extração foi realizada por hidrodestilação em um aparelho tipo Clevenger. Amostras de 30 g de folhas secas foram trituradas junto a 600 mL de água destilada em liquidificador. O período de extração foi de 2,5 h. O óleo essencial destilado foi armazenado em frasco âmbar e acondicionado a -4°C antes de análises complementares (Hussain *et al.*, 2008).

b) Teor e Rendimento do óleo essencial:

Foi realizada a pesagem de cada extração e diante da massa de óleo obtida, foi determinado o teor percentual de óleo essencial nas folhas:

$$\text{TOE (\%)} = \left(\frac{\text{Massa do óleo (g)}}{\text{Massa de folhas (g)}} \right) \times 100$$

O rendimento de óleo essencial foi calculado pela fórmula abaixo, de acordo com Brant *et al.* (2009):

$$\text{ROE (g planta}^{-1}\text{)} = \frac{\text{MST (g)} \times \text{MSO (g)}}{\text{Massa de folhas (g)}}$$

Onde, MST = massa seca total de folhas + ramos por planta (g) e MSO = massa do óleo obtido (g).

c) Identificação dos compostos presentes no óleo essencial:

Para a identificação e quantificação dos componentes do óleo essencial, as amostras foram diluídas em hexano a uma concentração de 1%. Uma alíquota de 1 µL desta solução foi injetada em um cromatógrafo gasoso acoplado em espectrômetro de massas (GC/MS) - Shimadzu (2010 Plus). O injetor foi mantido a 250 °C. Na separação dos constituintes foi utilizado a coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) e gás hélio como carreador (1 mL min⁻¹). A temperatura do forno foi programada de forma crescente de 60 a 240 °C a uma taxa de 3 °C min⁻¹. A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação de seus espectros de massas com banco de dados e também dos seus índices de retenção linear, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de *n*-alcanos (Van Den Dool; Kratz, 1963) e comparado com dados da literatura (ADAMS, 2017). Na quantificação dos compostos foi utilizado um CG com detector de ionização de

chamas (DIC) nas mesmas condições descritas acima, exceto pelo gás carreador utilizado (gás hidrogênio a $1,5 \text{ mL min}^{-1}$). A composição porcentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (%).

5.4 Análise estatística

Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo teste Shapiro Wilk e homogeneidade de variância pelo teste Bartlett, ambos ao nível de significância de 0,05. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo Teste F ($p \leq 0,05$). Quando houve significância, as médias foram comparadas utilizando o teste de Duncan ($p < 0,05$). Toda a análise estatística foi realizada com o software ASSISTAT®, e os gráficos plotados pelo SigmaPlot®.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de altura das plantas e massas fresca e seca da parte aérea não diferiram em relação ao tratamento controle (Figuras 2A, 1C e 1D). Já em relação ao número de ramos, as plantas tratadas com os elicitores AS 1 mmol L^{-1} e *Solieria chordalis* apresentaram reduções de 27,8% e 26,9%, respectivamente em comparação ao controle. Entretanto, essas reduções não se refletiram em diminuição da biomassa fresca e seca. Embora a literatura relacione a elicitação em plantas medicinais com o aumento da biomassa, os efeitos estariam sujeitos ao estágio fenológico, concentração de aplicação e espécie de planta estudada, uma vez que outras características podem ser influenciadas pelos compostos (Abbaszadeh *et al.*, 2020).

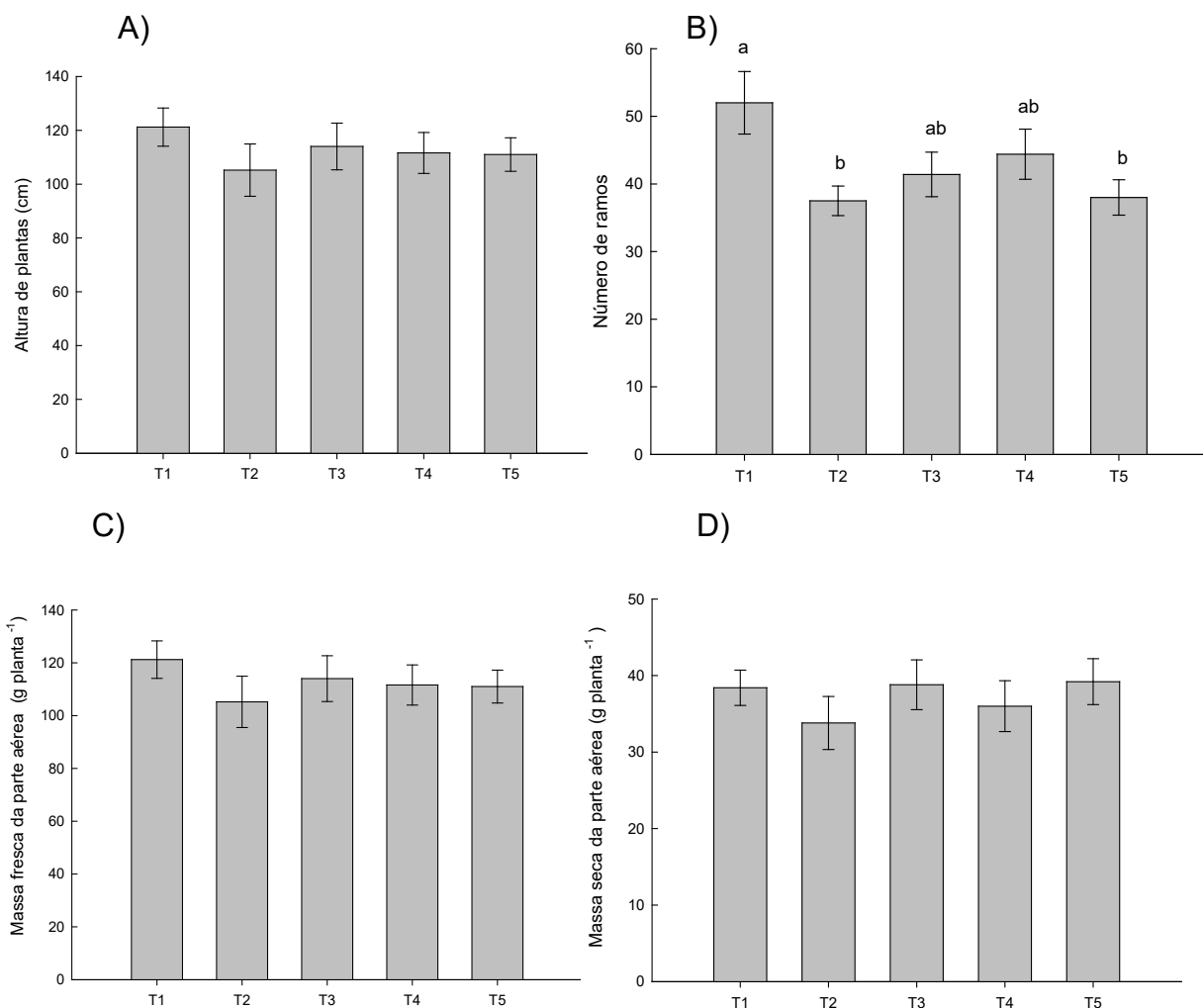


Figura 2. Altura de plantas (A), número de ramos (B), massa fresca da parte aérea (C) e massa seca da parte aérea (D) em plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle, T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹, T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹, T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Em relação à concentração de óleo essencial (Figura 3), verifica-se que os tratamentos com melhor resultado foram o AS 1 mmol L⁻¹, seguido pelo tratamento com *Solieria chordalis*; com aumentos de 46,04 e 35,69%, respectivamente, em relação as plantas controle. Paralelamente, o rendimento de óleo essencial foi maior para estes tratamentos (Figura 3), sendo que as plantas tratadas com *Solieria chordalis* (T5) e AS 1 mmol L⁻¹ apresentaram incrementos de 25,61% e 10,8%, respectivamente, em relação as plantas controle.

Os valores da concentração de OE obtidos neste estudo foram similares àqueles descritos por Ribeiro *et al.* (2018) em plantas de alecrim. Vale destacar que estes resultados de maior teor e rendimento de óleo essencial ocorreram nas plantas onde houve menor número de ramificações em resposta aos tratamentos de elicitación (Figura 2B). O não investimento em biomassa observado entre os tratamentos elicitores pode ser explicado pelo direcionamento de carbono para as rotas metabólicas envolvidas na formulação de compostos secundários (Legatt *et al.*, 2023); sendo neste caso as vias de biossíntese de terpenos.

A maior concentração de OE nas plantas tratadas com AS pode estar vinculada a atuação deste composto elicitador na estimulação do metabolismo secundário das plantas para diferentes grupos de compostos bioativos (GORNÍ *et al.* 2020). Resultados semelhantes foram obtidos por Abbaszadehet *et al.* (2020), onde a elicitación de plantas de alecrim sob déficit hídrico com AS 1 mmol L^{-1} induziu um maior rendimento na produção de óleo essencial. Segundo Kandoudi e Németh-Zámboriné (2022), as concentrações reduzidas de AS (até 1 mmol L^{-1}) estariam relacionadas ao maior rendimento de OE em plantas de manjerona quando comparadas às concentrações superiores a 1 mmol L^{-1} .

Os resultados superiores de concentração de OE, para o tratamento com *S. chordalis*, podem ser explicados pela ação sinérgica da combinação de eliciadores de metabólicos secundários como nitrogênio, fósforo, ferro, zinco, vitaminas, aminoácidos, hormônios vegetais, compostos fenólicos e polissacarídeos de parede celular (carragenanas) presentes no extrato de alga marinha. Tais compostos orgânicos podem estimular o aumento da concentração de OE em plantas tratadas (Ghatas *et al.*, 2021). A elicitación *in vivo* do alecrim utilizando-se diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares também resultou em plantas com maior concentração de óleo essencial, associado a características como aroma e sabor, porém sem comprometer o tamanho e a uniformidade das mesmas (Leggatt *et al.*, 2023).

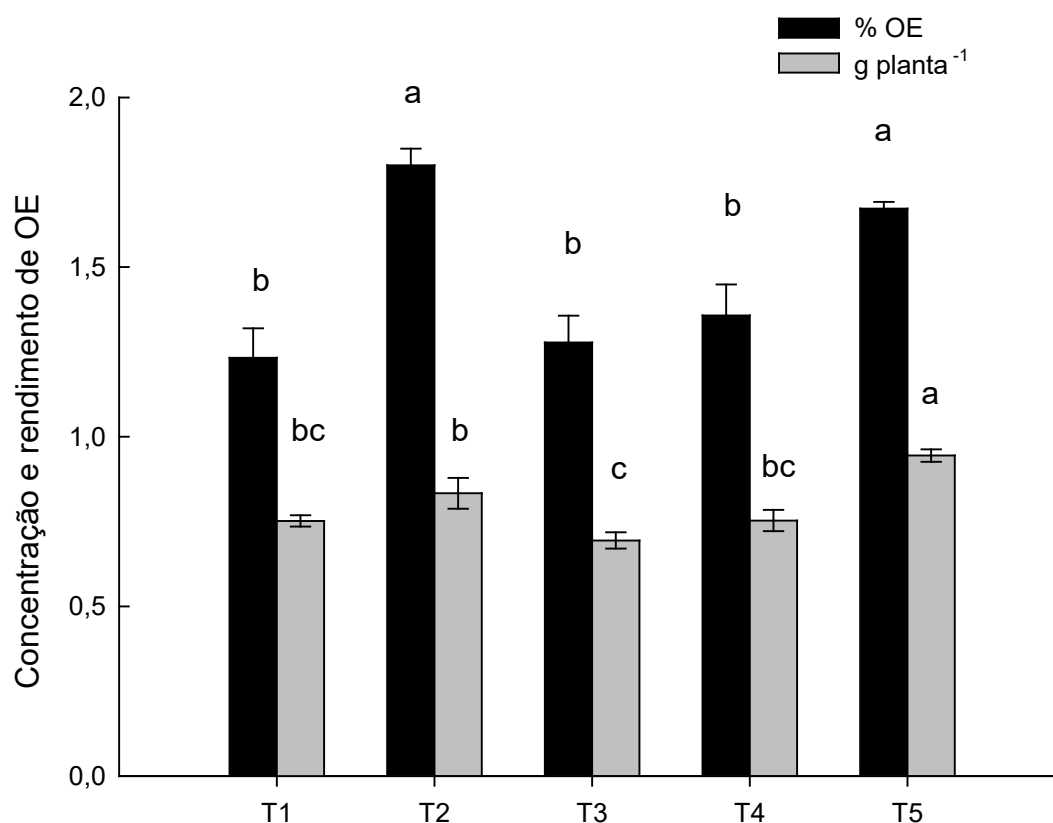


Figura 3. Concentração e rendimento de óleo essencial (OE) em plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Nas folhas do alecrim são encontrados polifenóis ácidos e flavonoides na fração não volátil (Pizani *et al.*, 2023). Neste estudo, a concentração foliar de polifenóis totais não foi alterada pelos tratamentos de elicitação em relação ao controle (Figura 3). Entretanto, as plantas tratadas com AS 1 mmol L⁻¹ (T2) e *A. nodosum* (T4), apresentaram maior concentração de polifenóis em relação às plantas do tratamento com *S. chordalis* (T5).

As concentrações de polifenóis encontradas neste estudo (de 4 a 5 mg de equivalentes de ácido gálico por grama de folha), foram similares às aquelas observadas por LEGGATT *et al.* (2023). Entretanto, estes autores observaram aumento na concentração de polifenóis totais em resposta à elicitação com fungos micorrízicos arbusculares.

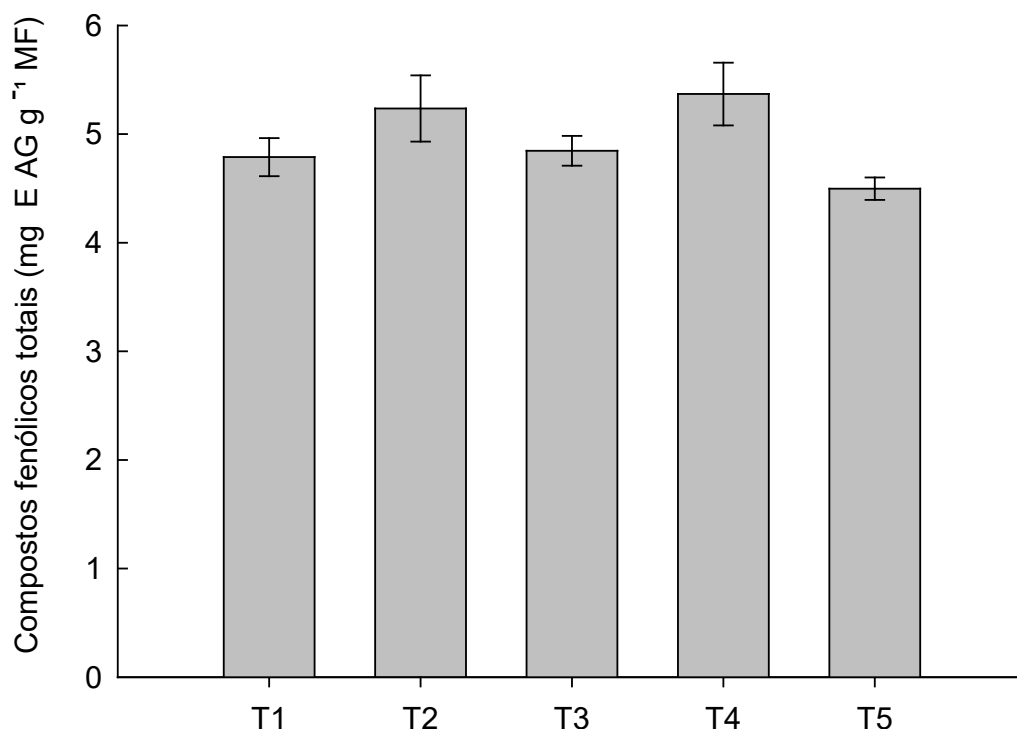


Figura 4. Concentração foliar de polifenóis totais em plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Na avaliação da atividade antioxidante via sequestro do radical sintético DPPH, verifica-se ausência de variação entre os tratamentos de elicitação e o tratamento controle (Figura 5). Este resultado é diferente do esperado, já que em geral a elicitação promove aumento de atividade antioxidante, como verificado em plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (Perez-Tortosa *et al.*, 2012), erva-doce (*Foeniculum vulgaris* L.) (Gorni *et al.* 2017), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe.) (Ghasemzadeh *et al.*, 2012) e mil-folhas (*Achillea millefolium* L.) (Gorni *et al.*, 2021). Porém, em geral, o aumento da atividade antioxidante quando determinada pelo método do DPPH apresenta correlação positiva com a maior concentração de polifenóis como ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas (Perez *et al.*, 2014; Gorni *et al.*, 2021). Como neste estudo não houve diferença quanto à concentração de compostos fenólicos totais (Figura 4), isto explica em partes a ausência de variação da atividade antioxidante via DPPH.

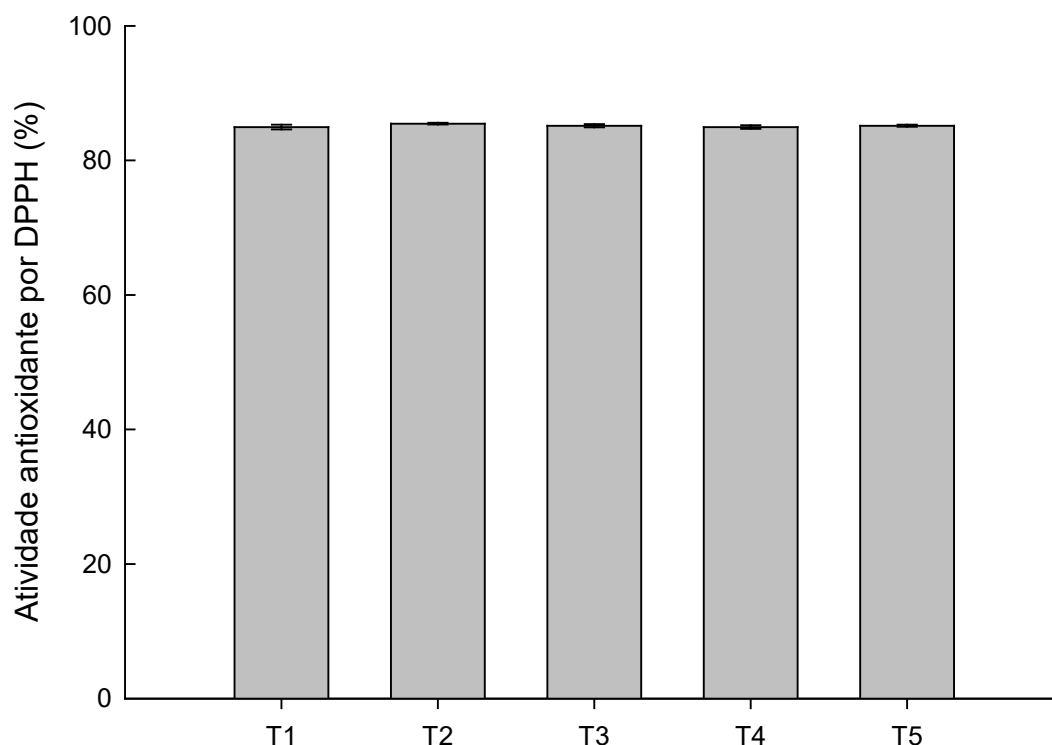


Figura 5. Atividade antioxidante por DPPH em plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

As concentrações de carboidratos solúveis totais nas folhas foram maiores nas plantas tratadas com AS 2 mmol L⁻¹, *Solieria chordalis* e *Ascophyllum nodosum*, com aumentos de 96,87%, 84,37% e 53,75%, respectivamente, em relação às plantas controle (Figura 6). Estes resultados corroboram com os achados em *Varronia curassavica*, onde ocorreram incrementos tanto no óleo essencial como na concentração de açúcares solúveis nas folhas em resposta à elicitação in vivo das plantas com AS e *Ascophyllum nodosum* (Ramos Melo, 2023). Os incrementos na concentração de carboidratos devido à aplicação de AS estariam relacionados ao efeito positivo deste regulador vegetal sobre os Centros de Reação do Fotossistema II e sobre a atividade da enzima Ribulose 1,5 – bifosfato carboxilase – oxigenasse (RUBISCO) (Hayat *et al.*, 2010). O AS também teria papel na alteração da

translocação do floema e na ativação de enzimas como a sacarose sintase e sacarose fosfato sintase (Dong *et al.*, 2011; Gadi; Laxmi, 2012). Por outro lado, o efeito estimulatório dos diferentes extratos de alga marinha é explicado pela regulação da expressão gênica, onde a resposta positiva está ligada a genes-chave envolvidos na degradação de polissacarídeos (*9SEX1* e *SEX4*) e na biossíntese de carboidratos (*GOLS2* e *GOLS3*), além da regulação negativa da degradação de sacarose (Ali *et al.*, 2021).

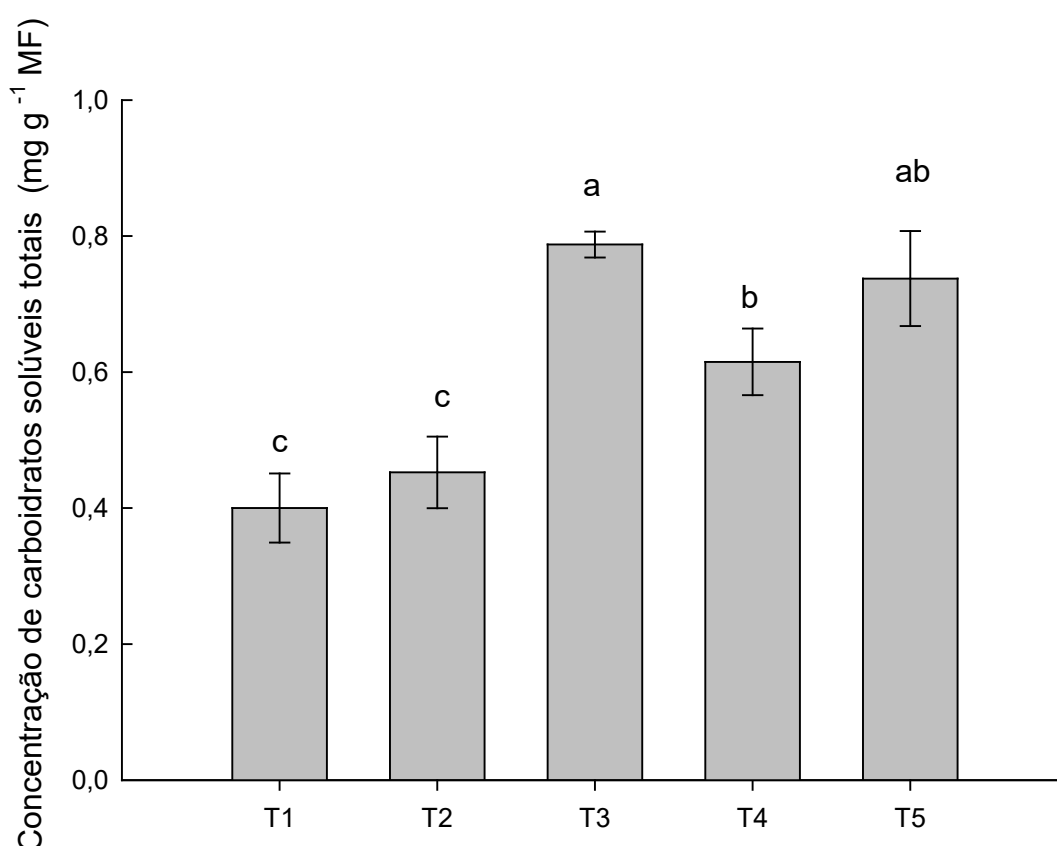


Figura 6. Concentração de carboidratos solúveis totais em folhas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

A elicitação tem o potencial de aumentar a quantidade de óleo essencial presente nas plantas aromáticas e também modificar a sua composição química (KANDOUDI e NÉMETH – ZAMBORINÉ, 2022). Os principais constituintes presentes no óleo essencial são listados na Tabela 2. Foram identificados 21

compostos, correspondendo a 95,66%; 95,65%, 95,25%, 95,72% e 95,69% da composição total do óleo essencial para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente. Os principais voláteis que compõem o perfil do óleo essencial são os monoterpenos oxigenados (51,5% – 54,35 %), seguidos pelos monoterpenos hidrocarbonetos (40,36% – 43,2 %), enquanto que os sesquiterpenos hidrocarbonetos aparecem em pequenas quantidades. Esta composição se assemelha àquelas encontradas em diferentes quimiotipos de alecrim (Leporini *et al.*, 2020; Xylia *et al.*, 2022).

Os compostos majoritários presentes no óleo essencial foram o α –pineno, o mirceno, o 1,8-cineol e a cânfora (Figura 7). Não foram encontradas diferenças nas proporções relativas destes compostos majoritários em resposta aos tratamentos de elicitação (Tabela 3). Desta forma, torna-se importante ressaltar que os tratamentos de elicitação, embora tenham promovido aumentos expressivos na quantidade de óleo essencial na planta, não causam modificação no perfil químico do óleo essencial; o que é altamente desejável para a indústria.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial em plantas de *Salvia rosmarinus* submetidas a tratamentos de elicitación (T1 = controle, T2 = AS 1,0mM, T3 = AS 2,0mM, T4= *Ascophyllum nodosum* e T5= *Solieria chordalis*).

Pico	Composição	IRC	IRT	T1 (%)	T2(%)	T3(%)	T4(%)	T5(%)
1	α -pineno	931	932	19,07 $\pm$ 0,99	19,79 $\pm$ 0,56	18,99 $\pm$ 2,17	19,27 $\pm$ 1,37	19,81 $\pm$ 1,17
2	canfeno	945	946	5,79 $\pm$ 0,28	6,25 $\pm$ 0,13	6,34 $\pm$ 0,35	6,05 $\pm$ 0,13	6,32 $\pm$ 0,44
3	β -pineno	974	974	2,26 $\pm$ 0,18	2,29 $\pm$ 0,09	2,13 $\pm$ 0,07	2,06 $\pm$ 0,26	2,08 $\pm$ 0,11
4	mirceno	990	988	15,07 $\pm$ 0,56	15,67 $\pm$ 0,46	16,56 $\pm$ 2,43	15,96 $\pm$ 0,94	16,44 $\pm$ 0,93
5	α -terpineno	1015	1014	0,85 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,09	0,90 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,05
6	o-cimeno	1022	1022	0,98 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,14	0,93 $\pm$ 0,04	1,04 $\pm$ 0,05
7	limoneno	1026	1024	4,66 $\pm$ 0,13	4,85 $\pm$ 0,16	5,07 $\pm$ 0,69	4,85 $\pm$ 0,10	4,95 $\pm$ 0,24
8	1,8-cineol	1028	1026	12,18 $\pm$ 0,47	12,13 $\pm$ 0,50	11,43 $\pm$ 1,12	11,41 $\pm$ 0,18	12,15 $\pm$ 0,71
9	γ -terpineno	1055	1054	1,66 $\pm$ 0,09	1,85 $\pm$ 0,21	1,70 $\pm$ 0,15	1,72 $\pm$ 0,10	1,64 $\pm$ 0,15
10	terpinoleno	1086	1086	1,17 $\pm$ 0,03	1,23 $\pm$ 0,07	1,24 $\pm$ 0,16	1,25 $\pm$ 0,03	1,20 $\pm$ 0,06
11	linalool	1099	1095	1,55 $\pm$ 0,16	1,45 $\pm$ 0,08	1,70 $\pm$ 0,25	1,66 $\pm$ 0,26	1,59 $\pm$ 0,33
12	crisantenona	1122	1124	0,54 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,06
13	canfora	1141	1141	23,01 $\pm$ 1,30	21,30 $\pm$ 0,89	21,67 $\pm$ 3,92	22,55 $\pm$ 1,91	21,17 $\pm$ 1,91
14	pinocarvona	1152	1160	0,11 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
15	p-menta-1,5-dien-8-ol	1158	1166	0,23 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,02
16	borneol	1161	1165	1,37 $\pm$ 0,16	1,26 $\pm$ 0,04	1,25 $\pm$ 0,20	1,28 $\pm$ 0,16	1,20 $\pm$ 0,08
17	α -terpineol	1187	1186	1,49 $\pm$ 0,08	1,35 $\pm$ 0,12	1,43 $\pm$ 0,15	1,42 $\pm$ 0,12	1,32 $\pm$ 0,16
18	Verbenona	1206	1204	2,32 $\pm$ 0,38	1,94 $\pm$ 0,46	2,09 $\pm$ 0,53	2,23 $\pm$ 0,38	1,75 $\pm$ 0,14
19	acetato de bornila	1282	1284	0,41 $\pm$ 0,19	0,56 $\pm$ 0,14	0,39 $\pm$ 0,16	0,47 $\pm$ 0,19	0,45 $\pm$ 0,21
20	(E)-cariofileno	1412	1417	0,82 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,05	0,83 $\pm$ 0,05
21	α -humuleno	1445	1452	0,14 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02
Total identificado				95,66	95,65	95,25	95,72	95,69
Grupos de Compostos (%)								
Monoterpenos oxigenados				51,5	53,86	54,02	52,98	54,35
Monoterpenos hidrocarbonetos				43,2	43,2	40,63	41,7	40,36
Sesquiterpenos				0,96	1,03	1,01	1,03	0,98

IRC = Índice de retenção calculado, usando series homólogas de C9-C14 alcanos

IRT = Índice de retenção tabelado, retirado de Adams (2017)

dp = desvio padrão

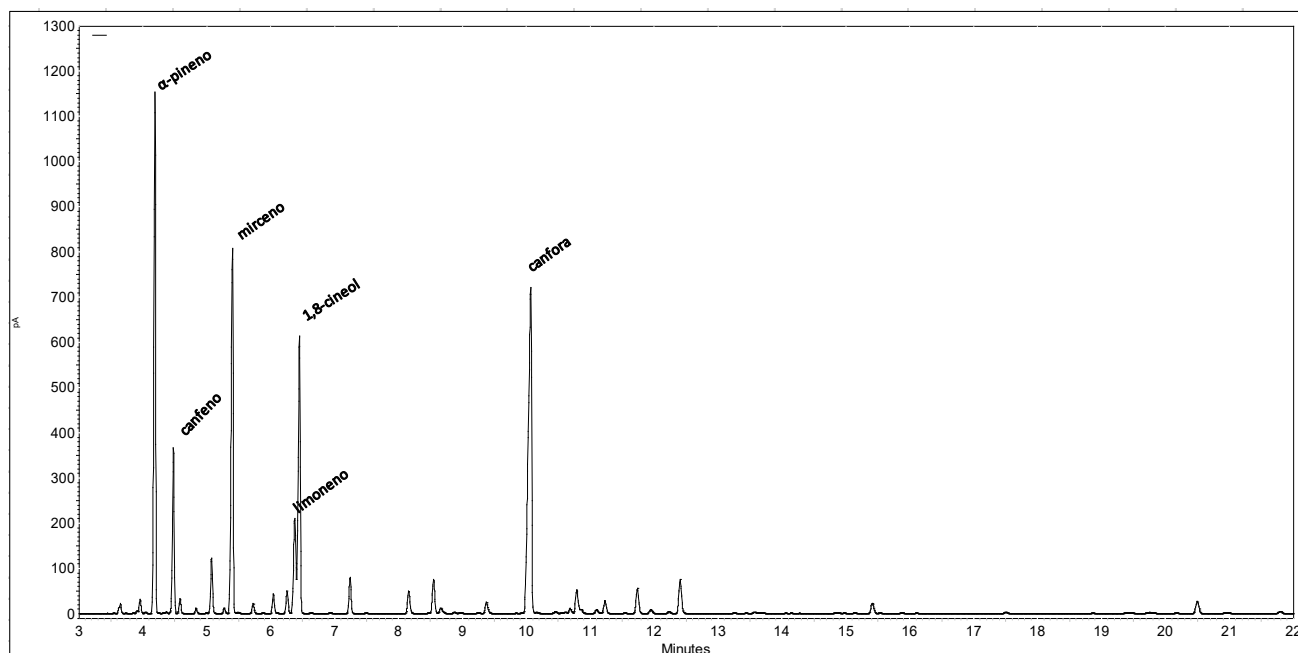


Figura 7. Cromatograma do óleo essencial de plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação, evidenciando os compostos majoritários α -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, 1,8 cineol e canfora.

Tabela 3. Proporções relativas (%) dos componentes majoritários (α -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, 1,8-cineol e canfora) presentes no óleo essencial de plantas de *Salvia rosmarinus* em resposta a diferentes tratamentos de elicitação (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹)

Composição	T1	T2	T3	T4	T5
α -pineno	19,07 $\pm$ 0,99	19,79 $\pm$ 0,55	18,99 $\pm$ 2,17	19,27 $\pm$ 1,36	19,81 $\pm$ 1,16
canfeno	5,79 $\pm$ 0,27	6,25 $\pm$ 0,13	6,34 $\pm$ 0,34	6,05 $\pm$ 0,12	6,32 $\pm$ 0,44
mirceno	15,07 $\pm$ 0,55	15,67 $\pm$ 0,46	16,56 $\pm$ 2,43	15,96 $\pm$ 0,93	16,44 $\pm$ 0,92
limoneno	4,66 $\pm$ 0,13	4,85 $\pm$ 0,15	5,07 $\pm$ 0,68	4,85 $\pm$ 0,10	4,95 $\pm$ 0,24
1,8-cineol	12,18 $\pm$ 0,46	12,13 $\pm$ 0,49	11,43 $\pm$ 1,12	11,41 $\pm$ 0,18	12,15 $\pm$ 0,71
Canfora	23,01 $\pm$ 1,29	21,30 $\pm$ 0,89	21,67 $\pm$ 3,92	22,55 $\pm$ 1,90	21,17 $\pm$ 1,91
F	0,33 ns	2,48 ns	0,89 ns	1,42 ns	0,51 ns
CV (%)	7,02	4,77	8,03	5,68	10,22

Letras diferentes na linha indicam diferença estatística pelo teste Duncan ($p < 0,05$).

O extrato de alecrim é utilizado como antioxidante natural na indústria alimentícia, em substituição aos antioxidantes sintéticos. Alimentos que contêm óleos e gorduras são passíveis de sofrer oxidação, com geração de odor e sabor desagradáveis, além da formação de compostos tóxicos (Del Ré; Jorge, 2012). A atividade antioxidante do alecrim se deve à presença do ácido rosmarínico (um ácido fenólico, hidrofílico) e principalmente do ácido carnósico (um diterpeno fenólico, hidrofóbico).

Neste estudo, foi considerada a hipótese de que a elicitação das plantas de *S. rosmarinus* poderia resultar em aumentos concomitantes da síntese de óleo essencial e da síntese de ácido carnósico, desde que ambos os compostos são produzidos pelas mesmas vias metabólicas (vias MVA e DXP). Em relação ao ácido carnósico (AC), verificou-se que nas amostras coletadas anteriormente à última aplicação foliar (= tempo 0 h de elicitação), não houve diferença entre os tratamentos. Porém, após 24 horas da aplicação dos elicitores, o tratamento com AS 2 mmol L⁻¹ resultou em aumento de 49,87% na concentração foliar de ácido carnósico. Já na coleta realizada 48 horas após a aplicação, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Tais resultados podem ser explicados pela rápida degradação do composto AC, como efeito da natureza instável do mesmo. Desta forma, sugere-se que a síntese de AC foi estimulada em resposta ao AS nas primeiras 48 horas após a aplicação, mas o mesmo foi rapidamente degradado em outras formas mais estáveis (Figura 8).

Por fim, na coleta de folhas realizada no momento da colheita (final do experimento e aos 30 dias após a última aplicação foliar), observou-se que as plantas tratadas com os compostos elicitores apresentaram concentrações de AC superiores ao controle, com aumentos de 60,2%, 59,81%, 54,3%, 68,11% ; respectivamente, para os tratamentos T2, T3, T4 e T5, os quais se equipararam estatisticamente. No caso específico do ácido salicílico, sugere-se que essa resposta esteja vinculada a mudanças na homeostase de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas plantas tratadas. Dependendo da concentração de AS aplicadas e das condições ambientais, este elicitor pode atuar tanto como um estimulador da acumulação de EROS via inibição da atividade de enzimas antioxidantes (especialmente a catalase); como também atua como um supressor de EROS, diminuindo os efeitos negativos do estresse oxidativo celular (Saleem *et al.*, 2021; Stasińska-Jakubas, 2023). Portanto, neste estudo, a aplicação de AS

provavelmente desencadeou a produção de EROS nas células em concentração adequada para que estes compostos atuassem como sinalizadores, induzindo respostas de defesa como a estimulação das vias metabólicas secundárias de produção de terpenos e resultando, portanto, no aumento da concentração do diterpeno ácido carnósico (AC).

A resposta de aumento de AC promovida pelos extratos de algas envolve uma rápida absorção por receptores de membrana e interação nos tecidos vegetais, desencadeando uma série de eventos celulares em cascata. Tais eventos culminam também na indução de respostas de defesa e síntese de compostos secundários. Os extratos de alga induzem um aumento da expressão gênica relacionada com as vias metabólicas de produção de terpenos – vias MVA e DXT (Ali *et al.*, 2021), resultando em aumento da concentração de ácido carnósico nas plantas tratadas.

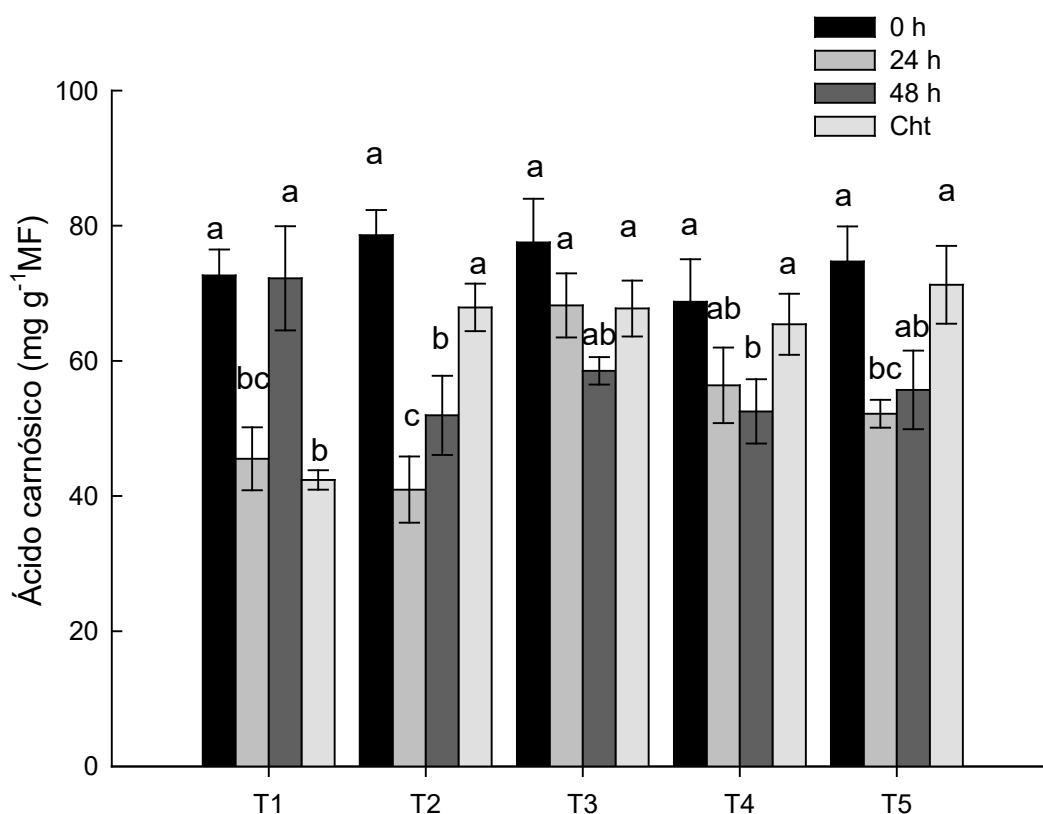


Figura 8. Concentração foliar de ácido carnósico em folhas de *Salvia rosmarinus* nos tempos 0, 24 e 48 horas após a última aplicação dos elicitores e após a colheita das plantas (cht). (T1 = controle; T2 = Ácido Salicílico 1,0 mmol L⁻¹; T3 = Ácido Salicílico 2,0 mmol L⁻¹; T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Em relação ao carnosol (Figura 9), verifica-se que no tempo 0 não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Na coleta realizada 24 hora após a aplicação foliar dos elicitores verifica-se que apenas o tratamento com *A. nodosum* (T4), resultou em aumento de 28,1% em relação ao controle. Na coleta realizada após 48h de aplicação dos elicitores foram observados incrementos na concentração foliar COL para os tratamentos com *A. nodosum*. e *S. chordalis*, com aumentos de 28,2% e 23,85%, respectivamente. Por fim, na coleta foliar realizada no final do experimento, verificou-se que a concentração de COL foi superior em todos os tratamentos de elicitação quando comparados ao controle, com aumentos de 51,61% e 46,95%, respectivamente para os tratamentos com AS 2 Mm (T3) e *S. chordalis* (T5) e aumentos de 112,35 % e 91,32% para os tratamentos com AS 1 mmol L⁻¹ (T2) e *A. nodosum* (T4). Seró et al. (2019), ao estudar o perfil metabólico de plantas de *S. rosmarinus* em resposta à inoculação com fungos micorrízicos também verificaram variação expressiva na concentração de carnosol.

O ácido carnósico é bastante instável e sua degradação por oxidação leva à formação de carnosol (metil éster do ácido carnósico). Desta forma, o carnosol está intimamente relacionado ao ácido carnósico, e é o principal diterpeno fenólico presente nos extratos de alecrim (Del Baño et al., 2003; johnson, 2011). Ambos os diterpenos são os componentes que respondem por 90% da atividade antioxidante dos extratos de alecrim. Embora o ácido carnósico possua maior capacidade antioxidante em comparação ao carnosol, este último possui mecanismo de ação mais rápido contra os radicais oxidativos, como também apresenta maior tempo de duração e estabilidade (Del Ré e Jorge, 2012; Mira-Sánchez., et al 2020).

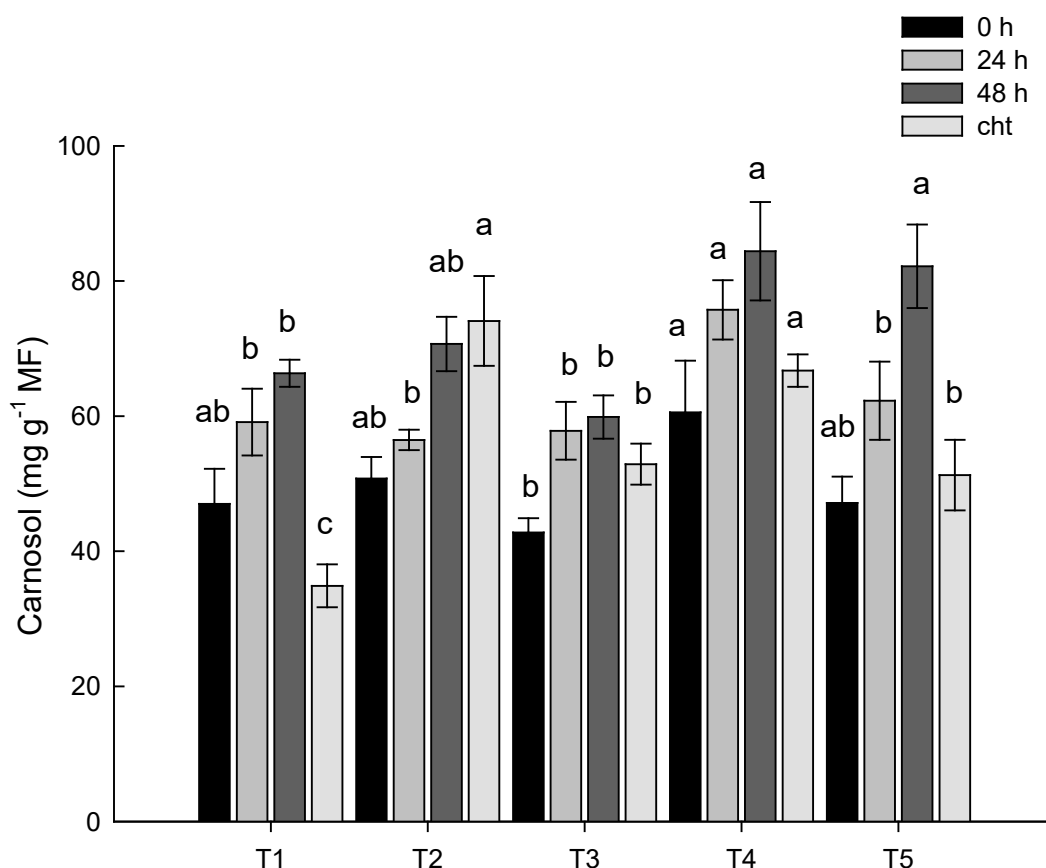


Figura 9. Concentração foliar de carnosol em plantas de *Salvia rosmarinus* nos tempos 0, 24 e 48 horas após a última aplicação e após a colheita (cht), dos tratamentos elicidores elicitação (T1 = controle, T2 = Ácido Salicílico 1,0mM, T3 = Ácido Salicílico 2,0mM, T4= *Ascophyllum nodosum* 0,6 mL L⁻¹ e T5= *Solieria chordalis* 0,2 mL L⁻¹). Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

A relação entre as concentrações de carnosol e ácido carnósico em plantas de alecrim está relacionada à idade das folhas e às condições ambientais, sendo que os estresses abióticos aos quais as plantas são submetidas exercem influência negativa na concentração destes (Birtic *et al.*, 2015).

Até o presente momento, são poucos os relatos sobre o efeito de compostos elicitores na produção dos diterpenos ácido carnósico (AC) e carnosol (COL) em plantas de alecrim. De acordo com os resultados deste estudo, é possível inferir que elicitação de plantas de *S. rosmarinus* com AS e EAM resultou em promoção da biossíntese de AC. Porém, nos primeiros dias após a aplicação dos elicitores sugere-se que tenha ocorrido maior taxa de oxidação do AC em COL. Passados 30

dias após a aplicação, maiores concentrações de AC e COL foram observadas em todos os tratamentos de elicitación, revelando, portanto, uma menor taxa de conversão destes dois compostos. Entretanto, experimentos e análises adicionais são necessários para se confirmar esta proposição.

7 CONCLUSÃO

A elicitação de plantas de alecrim com ácido salicílico e extrato de alga marinha incrementa as vias metabólicas de produção de terpenos, favorecendo a síntese de óleo essencial e a oxidação do ácido carnósico em carnosol, independentemente de alterações na biomassa fresca e seca das plantas.

REFERÊNCIAS

ABBASZADEH, B. *et al.* Improving water use efficiency through drought stress and using salicylic acid for proper production of *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v.144, p.111893, 2020.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. Academic press, 2012.

ALI, O.; RAMSUBHAG, A.; JAYARAMAN, J. Biostimulant Properties of Seaweed Extracts in Plants: Implications towards Sustainable Crop Production. **Plants**, v. 10, n. 3, p. 531, 2021.

ANAND, K. *et al.* Aromatic plants based environmental sustainability with special reference to degraded land management, **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 22, 2021.

BIRTIC, S. *et al.* Carnosic acid. **Phytochemistry**, v. 115, p. 9-19, 2015.

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

BOIX, Y. F. *et al.* Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 255-257, 2010.

CARVALHO, M. E. A. **Efeitos do extrato de *Ascophyllum nodosum* sobre o desenvolvimento e produção de cultivos**. Dissertação (Mestrado) – Piracicaba, 2013.

CUVELIER, M.-E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of Sage and Rosemary. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 73, p. 645-652, 1996.

DEL BAÑO, M. J. *et al.* Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4247–4253, 2003.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 389-399, 2012.

DREW, B.T.; GONZÁLEZ-GALLEGOS, J.G.; XIANG, C.L.; KRIEBEL, R.; DRUMMOND, C.P.; WALKER, J.B.; SYTSMA, K.J. *Salvia* united: The greatest good for the greatest number. **Taxon**, v. 66, p. 133–145, 2017.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DUCATTI, R. D. B. *et al.* Photosynthesis, salicylic acid content and enzyme activity of triticum aestivum L. influenced by the use of a seaweed biostimulant based on solieria chordalis. **Journal of Plant Growth Regulation**, 2024.

ES-SBIHI, F. Z.; HAZZOUMI, Z.; AMRANI JOUTEI, K. Effect of salicylic acid foliar application on growth, glandular hairs and essential oil yield in *Salvia officinalis* L. grown under zinc stress. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 7, p. 26, 2020.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, 2017.

GHATAS, Y. *et al.* Enhancing growth, productivity and artemisinin content of *Artemisia annua* L. Plant using seaweed extract and micronutrients. **Industrial Crops and Products**, v. 161, 2021.

GORNI, P. H. *et al.* Increased biomass and salicylic acid elicitor activity in fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. e2016172, 2017.

GORNI, P. H. *et al.* Salicylic acid foliar application increases biomass, nutrient assimilation, primary metabolites and essential oil content in *Achillea millefolium* L. **Scientia Horticulturae**, v. 270, p. 109436, 2020.

GORNI, P. H. *et al.* Elicitation Improves the Leaf Area, Enzymatic Activities, Antioxidant Activity and Content of Secondary Metabolites in *Achillea millefolium* L. Grown in the Field. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 1652-1666, 2021.

GRZESZCZUK, M.; SALACHNA, P.; MELLER, E. Changes in Photosynthetic Pigments, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of *Salvia coccinea* Buc'hoz Ex EtI. Induced by Exogenous Salicylic Acid and Soil Salinity. **Molecules**, n. 23, p. 1296, 2018.

HAJE INSUMOS ORGÂNICOS. 2020. Disponível em <https://hajeinsumosorganicos.com.br/>. Acesso em: 16 set. 2020.

HAO, X. *et al.* Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on tanshinone production and biosynthetic gene expression in transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 24-31, abr. 2015.

HAYAT, Q. *et al.* Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 14–25, mar. 2010.

HARDOUIN, K. *et al.* Biochemical and antiviral activities of enzymatic hydrolysates from different invasive French seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 1029–1042 2014.

HONORATO, A. C. *et al.* Colored shade nets and different harvest times alter the growth, antioxidant status, and quantitative attributes of glandular trichomes and

essential oil of *Thymus vulgaris* L. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 35, p. 100474, 2023.

HUSSAIN, A. I. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, p. 986-995, 2008.

JOHNSON, J. J. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. **Cancer Letters**, v. 305, n. 1, p. 1–7, jun. 2011.

KANDOUDI, W., NÉMETH-ZÁMBORINÉ, É. Stimulating secondary compound accumulation by elicitation: Is it a realistic tool in medicinal plants in vivo? **Phytochemistry Reviews**, v. 21, 2022

KHAN, W. *et al.* Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 386–399, 2009.

KENDEL, M. *et al.* Lipid Composition, fatty acids and sterols in the seaweeds *Ulva armoricana*, and *Solieria chordalis* from Brittany (France): an analysis from nutritional, chemotaxonomic, and antiproliferative activity perspectives. **Marine Drugs**, 13, 5606-5628, 2015.

LEGGATT, E. *et al.* A adição de fungos micorrízicos arbusculares aumenta a expressão da terpeno sintase em cultivares de *Salvia rosmarinus*. **Life**, v. 13, n. 2, pág. 315, 2023.

LEPORINI, M. *et al.* The essential oil of *Salvia rosmarinus* Spenn. from Italy as a source of health-promoting compounds: chemical profile and antioxidant and cholinesterase inhibitory activity. **Plants**, v. 9, p. 798, 2020.

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

MACEDO, L. M. *et al.* Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and its topical applications: a review. **Plants**, v. 9, n. 5, p. 651, 2020.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. p. 319.

MAY, A. *et al.* Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 2, p. 195-200, 2010.

MEI, L. *et al.* Pretreatment with salicylic acid and ascorbic acid significantly mitigate oxidative stress induced by copper in cotton genotypes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 13, p. 9922-9931, 2015.

MIRA-SÁNCHEZ, M. D. *et al.* Comparative study of rosemary extracts and several synthetic and natural food antioxidants. Relevance of carnosic acid/carnosol ratio,

Food Chemistry, v. 309, p. 125688, 2020.

MIRZAJANI, Z.; HADAVI, E.; KASHI, A. Changes in the essential oil content and selected traits of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) as induced by foliar sprays of citric acid and salicylic acid. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 269-274, 2015.

MUKHERJEE, A.; Patel, J. S. Extrato de algas marinhas: bioestimulador de defesa vegetal e produtividade vegetal. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, p. 553–558, 2020.

MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 118, n. 1, p. 1-16, 2014.

MUSTAFAVI, S. H. *et al.* Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 6, p. 102, 2018.

NAIK, P. M.; AL-KHAYRI, J. M. Impact of abiotic elicitors on *in vitro* production of plant secondary metabolites: a review. **Journal of Advanced Research in Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2016.

OKUMA, E. *et al.* Accumulation of endogenous salicylic acid confers drought tolerance to Arabidopsis. **Plant Signaling e Behavior**, v. 9, n. 3, e28085, 2014.

PÉREZ, M. G. F. *et al.* Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. **Food Chemistry**, v. 156, p. 273-278, 2014.

PETERS, R. J. Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 11, p. 1521–1530, 2010.

PIRBALOUTI, A. G. *et al.* Chemical composition and yield of essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under foliar applications of jasmonic and salicylic acids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101144, 2019.

PIZANI, R. S. *et al.* Beyond aroma: A review on advanced extraction processes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and sage (*Salvia officinalis*) to produce phenolic acids and diterpenes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 127, p. 245–262, 2022.

RAFIEE, H. *et al.* Application of plant biostimulants as new approach to improve the biological responses of medicinal plants-A critical review. **Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 59, p. 6-39, 2016.

RAIJ, B. V. *et al.* Análise química para avaliação da fertilidade de solos Tropicais. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 285 p.

RAMOS MELO, E. *et al.* In vivo elicitation is efficient in increasing essential oil yield with high anti-inflammatory sesquiterpene content in *Varronia curassavica* Jacq. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 83, n. 3, p. 369-379, 2023.

RATHORE, S. S. *et al.* Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. **South African Journal of Botany**, v. 75, p. 351-355, 2009.

RIBEIRO, V. E. Relações da qualidade da radiação e do ácido salicílico em *Lavandula dentata* no desenvolvimento e produção de óleo essencial. 56f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.

RODRIGUES- BRANDÃO, I. *et al.* Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin in production from leaves of *Alternanthera tenella*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 10, p. 1893-1898, 2014.

SAEGER, J. *et al.* Toward the molecular understanding of the action mechanism of *Ascophyllum nodosum* extracts on plants. **Journal of Applied Phycology**, p.1-25, 2019.

SARMADI, M. *et al.* The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 132, p. 271-280, 2018.

SERÓ, R. *et al.* Modified distribution in the polyphenolic profile of rosemary leaves induced by plant inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 6, p. 2966-2973, 2019.

SALEEM, M.; FARIDUDDIN, Q.; CASTROVERDE, C. D. M. Salicylic acid: a key regulator of redox signalling and plant immunity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 168, p. 381-397, 2021.

STAGOS, D. *et al.* Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 11, p. 4115-4124, 2012.

STASIŃSKA-JAKUBAS, M. *et al.* Application of chitosan lactate, selenite, and salicylic acid as an approach to induce biological responses and enhance secondary metabolism in *Melissa officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 205, p. 117571, 2023.

SHARMA, H. S. *et al.* Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n.1, p. 465-490, 2014.

SUWAL, S. *et al.* Effects of high hydrostatic pressure and polysaccharidases on the extraction of antioxidant compounds from red macroalgae, *Palmaria palmata* and *Solieria chordalis*. **Journal of Food Engineering**, v. 252, p. 53-59, 2019.

SILVA, E. N. *et al.* Salicylic acid mitigates salinity effects by enhancing the growth, CO₂ assimilation, and antioxidant protection in *Jatropha curcas* plants. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 345-350, 2014.

SIMS, D. A.; GAMON, J. A. Relationships Between Leaf Pigment Content and Spectral Reflectance across a Wide Range of Species, Leaf Structures and Developmental Stages. **Remote Sensing and Environment**, v. 81, p. 337-354, 2002.

SZUMNY, A. *et al.* Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. **Journal of Food Engineering**, v. 97, n. 2, p. 253-260, 2010.

VENEGAS-MOLINA, J. *et al.* Induced tolerance to abiotic and biotic stresses of broccoli and Arabidopsis after treatment with elicitor molecules. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2020.

TAVARES, E. S. *et al.* Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 15, n. 1, 2005.

TAWFEEQ, A. *et al.* Does fertilizer type and method of application cause significant differences in essential oil yield and composition in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)? **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 17-22, 2016.

TRETTEL, J. R. *et al.* Effects of copper sulphate (CuSO₄) elicitation on the chemical constitution of volatile compounds and the in vitro development of Basil. **Scientia Horticulturae**, v. 234, p. 19-26, 2018.

VAN OOSTEN, M. J. *et al.* The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 5, p. 5, 2017.

WALY, A.A. *et al.* Effect of foliar spraying with seaweeds extract, chitosan and potassium silicate on *Rosmarinus officinalis* L. plants in sandy soil. **Scientific Journal of Flowers and Ornamental Plants**, v. 6, n. 3, p. 191-209. 2019.

XYLIA, P. *et al.* Application of rosemary and eucalyptus essential oils on the preservation of cucumber fruit. **Horticulturae**, v. 8, p. 774, 2022.

YAKHIN, O. I. *et al.* Biostimulants in plant science: a global perspective. **Frontiers in Plant Science** v.7, p. 2049, 2017.

YANG, J. *et al.* Bio-isoprene production using exogenous MVA pathway and isoprene synthase in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 642–647, 2012.