



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

PEDRO HENRIQUE GORNI

ATIVIDADE ELICITORA DO ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE O PERFIL DE
METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS COM POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DE *Achillea millefolium* L. CULTIVADA A CAMPO

Presidente Prudente - SP
2018



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

PEDRO HENRIQUE GORNI

**ATIVIDADE ELICITORA DO ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE O PERFIL DE
METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS COM POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DE *Achillea millefolium* L. CULTIVADA A CAMPO**

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

Orientadora:
Profa. Dra. Ana Cláudia Pacheco Santos

Co-orientador:
Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

Presidente Prudente - SP
2018

571.2
G671a

Gorni, Pedro Henrique.

Atividade elicitora do ácido salicílico sobre o perfil de metabólitos primários e secundários com potencial antioxidante de *Achillea millefolium* L. cultivada a campo / Pedro Henrique Gorni. – Presidente Prudente, 2018. 114f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2018.

Bibliografia.

Orientador: Ana Cláudia Pacheco Santos

Co-orientador: Regildo Márcio Gonçalves da Silva

1. Mil-folhas. 2. Alterações bioquímicas. 3. Compostos bioativos. 4. Fenilalanina Amônia-Liase. 5. Chalcona Sintase; I Título

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ATIVIDADE ELICITORA DO ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE O PERFIL DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *Achillea millefolium* L. CULTIVADA A CAMPO"

AUTOR: PEDRO HENRIQUE GORNI

ORIENTADORA: ANA CLAUDIA PACHECO SANTOS

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

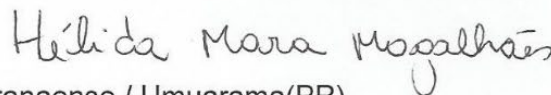
Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Ana Claudia Pacheco Santos



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

Hélida Mara Magalhães



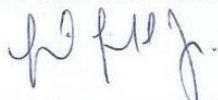
UNIPAR – Universidade Paranaense / Umuarama(PR)

Nelson Barbosa Machado Neto



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

Silvia Graciele Hülse de Souza



UNIPAR – Universidade Paranaense / Umuarama(PR)

Vânia Maria Ramos



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

Data da realização: 20 de novembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, que sempre torcem por mim e ao meu sobrinho Gabriel, a quem eu amo muito.

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta Tese de Doutorado, é agradecer todas as pessoas que estiveram ao meu lado. Houve contribuições de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçadas. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Deus, pois sem Ele, eu não teria forças para essa longa jornada. A meus pais, Claudio e Silvana, pelo apoio, confiança, paciência, que dignamente me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e caráter. Eu amo vocês.

Ao meu irmão, Guilherme, à minha cunhada Celiane e a meu sobrinho Gabriel, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho. Obrigado pela confiança e por acreditarem em mim.

À Profa. Dra. Ana Cláudia Pacheco Santos, minha orientadora, obrigado por confiar em mim, e me acolher entre seus orientados. Tenho orgulho por ter sido orientado no Mestrado e Doutorado por uma pessoa tão grandiosa, profissionalmente e pessoalmente.

Ao Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva, co-orientador, pela competência científica e auxílio para realização das análises da atividade antioxidante, bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas.

À Profa. Dra. Vânia Maria Ramos, por ceder o laboratório de Entomologia Agrícola para a confecção dos extratos e pelas parcerias na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (Santista) pela ajuda nos cálculos das atividades enzimáticas.

À Profa. Dra. Elizabeth Mie Hashimoto, pelo inestimável apoio nas análises estatísticas.

Aos meus avós, por todo amor que me ofereceram.

Aos meus tios, tias, primos e primas, por sempre confiaram em mim.

À minha querida amiga Kelen e sua família: Geison, Pedro Augusto e João Guilherme. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

Ao Heberton Polegato, pelo inestimável apoio e pela grande amizade.

Aos meus amigos que fiquei longe por tanto tempo, os quais estão ao meu lado sempre.

À Viviane Tavares, pela amizade, apoio prestado, convivência diária e pelas parcerias nos projetos. Agradeço muito a você e obrigado por sua amizade.

À Camila Zaniboni, pela amizade incrível que conquistei e por sempre estar ao meu lado, agradeço muito.

As amigadas que conquistei desde o mestrado até hoje, obrigado por fazerem parte desta etapa da minha vida, em especial para: Viviane Cacefo, Luciana Takamori, Jéssica Filleti, Flaive e Giovana Ferraresi.

Aos Engenheiros Agrônomos: Jonathan Fogaça e Ronaldo Moreli pela amizade, pelos churrascos, pelas cervejas, pelos trucos e por terem ajudado em todas as etapas desse projeto.

Aos alunos da agronomia: Juler, João Vitor, Gilberto, Luiz Henrique, João e Carlos; e ao aluno de engenharia ambiental: Lukas, pela ajuda no desenvolvimento do projeto no campo.

Ao estagiário Giovani Miranda, pela ajuda no segundo ano do projeto no campo e nas análises laboratoriais.

Aos amigos que conquistei durante esses anos.

Aos alunos do Laboratório de Fitoterápicos (FitoLab – UNESP, Assis), obrigado pela amizade.

Em especial à Pamella e Kamille, pelo auxílio no laboratório com as análises cromatográficas e antioxidantes e pela grande amizade.

Ao João Luiz Bronzel Junior, pelas análises cromatográficas.

Aos funcionários da UNOESTE, pela forma carinhosa que convivi com todos, pela disponibilidade manifestada e pelo incansável acompanhamento e apoio nas análises.

Às minhas amigas da limpeza, sim amigas, pois vocês faziam meus dias brilharem mais com suas histórias e besteiras que falavam. Saibam que jamais esquecerei de vocês.

Ao Grupo Gasparim que nos cedeu esterco para o experimento.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UNOESTE, que me incentivaram a crescer na vida acadêmica.

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

À UNESP de Assis que abriu as portas para que eu pudesse realizar as análises da atividade antioxidante do meu projeto.

À UNESP de Araraquara a qual realizei as análises cromatográficas.

Ao Centro de Estudos em Ecofisiologia do Oeste Paulista (CEVOP-UNOESTE) por proporcionar oportunidade e infraestrutura para realização desta pesquisa, além das amizades que conquistei.

À UNOESTE, a instituição que deu subsídios à minha formação de Mestre e Doutor e que me acolheu nesses anos.

Finalmente, a todos que participaram direta e indiretamente dessa fase importante da minha vida, a qual fiz sem medir forças para realizar da melhor maneira possível. Mais uma vez, a todos os meus sinceros agradecimentos.

“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”. (Albert Einstein)

RESUMO

Atividade elicitora do ácido salicílico sobre o perfil de metabólitos primários e secundários com potencial antioxidante de *Achillea millefolium* L. cultivada a campo

Elicitores são substâncias de ocorrência natural ou sintética, que estimulam a síntese de metabólitos secundários em vegetais. O composto fenólico Ácido Salicílico (AS) é um hormônio vegetal que atua sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo também considerado um elicitor abiótico. Nesta pesquisa avaliou-se o efeito do AS sobre a produção de biomassa e a síntese de compostos primários e secundários em mil-folhas (*Achillea millefolium* L. – Asteraceae), espécie medicinal produzida comercialmente como matéria prima para as indústrias de fitomedicamentos e bebidas. Os experimentos foram conduzidos em condições de campo em duas safras consecutivas nos anos de 2016 e 2017. O AS foi aplicado via pulverização foliar em duas concentrações (0 e 1,0 mmol L⁻¹) e em diferentes épocas fenológicas da cultura. Os efeitos do AS sobre a mil-folhas foram avaliados através de parâmetros biométricos de crescimento, parâmetros bioquímicos e análises qualitativas do óleo essencial (GC/MS) e dos compostos fenólicos e flavonóides (LC/MS). A aplicação exógena de AS resultou em aumentos na massa de matéria seca (folhas, raízes e total), na área foliar (total e específica) e razão de peso foliar. Houve aumento dos teores de pigmentos fotossintéticos em resposta ao AS. Os efeitos positivos sobre o metabolismo primário foram evidenciados pelas maiores concentrações de açúcares, proteínas e aminoácidos solúveis totais, como também teores de açúcares redutores totais, em ambas as épocas de aplicação do AS e anos de cultivo. Em relação ao metabolismo secundário foram obtidos aumentos de compostos fenólicos totais e flavonóides (evidenciados pela maior atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase), além de um maior teor e rendimento de óleo essencial em ambas as épocas de aplicação do AS e anos de cultivo. A atividade antioxidante do extrato vegetal, avaliada por diferentes testes *in vitro*, foi maior nas plantas tratadas com AS. A aplicação de AS nas diferentes épocas de aplicação e ano de cultivo resultou em aumentos nos compostos majoritários do óleo essencial, como o camazuleno, cariofileno, γ -terpineno, terpinen-4-ol e borneol. A identificação de compostos bioativos revelou a presença de derivados de quercetina, apigenina, ácido cafeoilquínico, ácido quínico, ácido cafeico, ácido clorogênico, amentoflavona, kaempferol e rutina. Os resultados desta pesquisa nos levam a afirmar que o AS exerceu tanto o efeito hormonal sobre aspectos bioquímicos e de crescimento, como também atuou como substância elicitora nas plantas de *A. millefolium*. Houve correlação positiva entre os maiores teores de compostos primários e os maiores teores de compostos secundários nas plantas tratadas com AS. Concluiu-se que a aplicação de 1,0 mmol L⁻¹ de AS na pré-colheita (aos 100 dias após o plantio) resulta em maior produtividade e uma maior concentração de compostos secundários com potencial antioxidante tornando-se viável à aplicação deste elicitor no cultivo comercial de *Achillea millefolium*.

Palavras-chave: Mil-folhas. Alterações bioquímicas. Compostos bioativos. Fenilalanina Amônia-Liase. Chalcona Sintase.

ABSTRACT

Salicylic acid elicitor activity on the profile of primary and secondary metabolites with antioxidant potential in field cultivated *Achillea millefolium* L.

Elicitors are substances of natural or synthetic occurrence, which stimulate the synthesis of secondary metabolites in vegetables. The phenolic compound Salicylic Acid (SA) is a plant hormone that acts on the growth and development of plants and is also considered an abiotic elicitor. This study evaluated the effect of SA on biomass production and the synthesis of primary and secondary compounds in yarrow (*Achillea millefolium* L. - Asteraceae), a medicinal species commercially produced as raw material for the phytomedicines and beverages industries. The experiments were conducted under field conditions in two consecutive harvests in the years 2016 and 2017. The SA was applied by foliar spraying at two concentrations (0 and 1.0 mmol L⁻¹) and at different phenological times of the crop. The effects of SA in yarrow were evaluated through biometric growth parameters, biochemical parameters and qualitative analysis of essential oil (GC/MS) and phenolic and flavonoid compounds (LC/MS). The exogenous application of SA resulted in increases of dry matter mass (leaves, roots and total), leaf area (total and specific), and leaf weight ratio. There was an increase in photosynthetic pigment contents in response to SA. The positive effects on the primary metabolism were evidenced by the higher concentrations of sugars, proteins and total soluble amino acids, as well as total reducing sugars contents, in both times of SA application and years of cultivation. Increases of total phenolic compounds and flavonoids (evidenced by the greater activity of the phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase enzymes) were observed, as well as a higher content and yield of essential oil in both SA application times and years of culture. The antioxidant activity of the plant extract, evaluated by different in vitro tests, was higher in the plants treated with SA. The application of SA at different times of application and year of cultivation resulted in increases in the major compounds of the essential oil, such as chamazulene, caryophyllene, γ -terpinene, terpinen-4-ol and borneol. The identification of bioactive compounds revealed the presence of quercetin derivatives, apigenin, caffeoylquinic acid, quinic acid, caffeic acid and chlorogenic acid, amentoflavone, kaempferol and rutin. The results of this research lead us to affirm that SA exerted both the hormonal effect on biochemical and growth aspects, and also acted as elicitor in *A. millefolium* plants. There was a positive correlation between the higher contents of primary compounds and the higher levels of secondary compounds in plants treated with SA. It was concluded that the application of 1.0 mmol L⁻¹ of SA in the pre-harvest (at 100 days after planting) results in higher productivity and a higher concentration of secondary compounds with antioxidant potential making it feasible to apply of this elicitor in the commercial crop of *Achillea millefolium*.

Keywords: Yarrow. Biochemical changes. Bioactive compounds. Phenylalanine Ammonia-Lyase. Chalcone Synthase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema das vias biossintéticas do ácido salicílico.....	20
Figura 2 -	Fluxograma da obtenção do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Achillea millefolium</i> L. por maceração.....	33
Figura 3 -	Fracionamento em uma coluna cromatográfica com 75% de Sílica Gel 60 (Sigma-Ildrich®) e 25% de sílica incorporada com 1,0 g de extrato hidroalcoólico.....	44
Figura 4 -	Dados climatológicos de Presidente Prudente, São Paulo, durante o período experimental (Maio - Setembro de 2016 e 2017).....	52
Figura 5 -	Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	70
Figura 6 -	Componentes principais obtidos por meio da composição química do óleo essencial de <i>Achillea millefolium</i> L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.....	71
Figura 7 -	Dendrograma (Ward,s) obtidos por meio da composição química do óleo essencial de <i>Achillea millefolium</i> L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.....	72
Figura 8 -	Componentes principais obtidos por meio das classes químicas do óleo essencial de <i>Achillea millefolium</i> L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.....	73
Figura 9 -	K-means obtidos por meio das classes químicas do óleo essencial de <i>Achillea millefolium</i> L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.....	73
Figura 10 -	Cromatograma do fracionamento do extrato hidroalcoólico (T3) de <i>A. millefolium</i> L. cultivadas em 2016 (A) e 2017 (B). Padrões: rutina, quercetina, Ácido Gálico e Ácido Ferúlico, em sistema eluente Clorofórmio-metanol-água (75:23:2). Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm)....	77
Figura 11 -	Cromatograma de LC/MS característicos dos extratos de <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise química do solo utilizado no experimento.....	29
Tabela 2 -	Massa de matéria seca de folhas (MSF), área foliar (AF) e número de folhas (NF) em plantas de <i>Achillea millefolium</i> L. tratadas com ácido salicílico.....	53
Tabela 3 -	Massa de matéria seca de raiz (MSR) e massa de matéria seca total (MST) em plantas de <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	54
Tabela 4 -	Área foliar específica (AFE) e razão raiz/parte aérea (RPA) de plantas de <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	55
Tabela 5 -	Razão de massa foliar (RMF) e razão de área foliar (RAF) de plantas de <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	57
Tabela 6 -	Teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg) e enxofre (S) nas folhas de <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	58
Tabela 7 -	Teor de cálcio (Ca) nas folhas de <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	58
Tabela 8 -	Teores de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b) e clorofila total (Cl t) em plantas de <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	60
Tabela 9 -	Teores de carotenóides e antocianinas em <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	61
Tabela 10 -	Teores de açúcares solúveis totais (AST), proteínas solúveis totais (PST), açúcares redutores totais (ART) e aminoácidos solúveis totais (AAST) em <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	63
Tabela 11 -	Teor (TOE) e rendimento (ROE) de óleo essencial em <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	66
Tabela 12 -	Cromatografia (GC/MS) do óleo essencial de <i>Achillea millefolium</i> L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.....	69
Tabela 13 -	Teores de polifenóis totais e flavonóides totais do extrato hidroalcoólico de <i>Achillea millefolium</i> L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.....	75

Tabela 14 -	Análise de compostos fenólicos e flavonóides por LC/MS em <i>Achillea millefolium</i> L.....	79
Tabela 15 -	Atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase (PAL) em <i>Achillea millefolium</i> L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.....	81
Tabela 16 -	Atividade da enzima Chalcona sintase (CHS) em <i>Achillea millefolium</i> L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.....	82
Tabela 17 -	Atividade antioxidante pelos métodos DPPH, TBARS, FRAP e NO do extrato hidroalcoólico de <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico.....	85
Tabela 18 -	Coefficiente de correlação entre metabólitos primários e secundários, atividade enzimática e atividade antioxidante de plantas de <i>Achillea millefolium</i> L. tratada com ácido salicílico....	90

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Aspectos da Cultura	18
3.1.1	<i>Achillea millefolium</i> (Linnaeus, 1753)	18
3.2	Ácido Salicílico: efeitos sobre processos fisiológicos da planta e atenuação de estresses biótico e abióticos	19
3.3	Ácido Salicílico: atuação como elicitor do metabolismo secundário	23
3.4	Propriedades antioxidante dos compostos fenólicos	25
3.5	Estresse oxidativo e antioxidantes naturais	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Parâmetros biométricos avaliados	31
4.1.1	Área foliar por planta	31
4.1.2	Número de folhas por planta	31
4.1.3	Massa de matéria seca de parte aérea, raízes e total	31
4.1.4	Razão raiz / parte aérea	31
4.1.5	Razão de área foliar	31
4.1.6	Área foliar específica	32
4.1.7	Razão de massa foliar	32
4.2	Preparo da solução hidroalcoólica de <i>Achillea millefolium</i> L.	32
4.3	Parâmetros bioquímicos avaliados	34
4.3.1	Teor de macronutrientes nas folhas	34
4.3.2	Pigmentos fotossintéticos	34
4.3.3	Teor de açúcares solúveis totais (mg g ⁻¹)	35
4.3.4	Determinação de açúcares redutores totais (mg L ⁻¹)	36
4.3.5	Teor de proteínas solúveis totais – PST (mg g ⁻¹)	36
4.3.6	Teor de aminoácidos solúveis totais (μmol g ⁻¹)	37
4.3.7	Extração de óleo essencial em folhas	37
4.3.8	Teor de polifenóis totais (μg mL ⁻¹)	38
4.3.9	Teor de flavonóides totais (μg mL ⁻¹)	39
4.3.10	Atividade enzimática da Fenilalanina Amônia-Liase (PAL, EC 4.3.1.5)	39
4.3.11	Atividade enzimática da Chalcona Sintase (CHS, EC 2.3.1.74)	40
4.4	Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de <i>Achillea millefolium</i> L.	41
4.4.1	Atividade sequestradora do radical livre DPPH	41
4.4.2	Atividade sequestradora de Óxido Nítrico (NO)	42
4.4.3	Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)	42
4.4.4	Atividade antioxidante pelo método FRAP	43
4.5	Cromatografia	43
4.5.1	Fracionamento biomonitorado de extratos	44
4.5.2	Cromatografia em camada delgada (CCD)	44
4.5.3	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC/MS)	45
4.5.4	Análises dos Componentes Principais (PCA) dos compostos presentes no óleo essencial	46
4.5.5	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS)	46
4.6	Análise estatística	50

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Dados climáticas	51
5.2	Parâmetros biométricos de crescimento	52
5.2.1	Biomassa	52
5.2.2	Partição de biomassa	55
5.2.3	Teor de macronutrientes	57
5.2.4	Fatores climáticos	59
5.3	Parâmetros bioquímicos	59
5.3.1	Metabolismo primário	59
5.3.1.1	Pigmentos fotossintéticos	59
5.3.1.2	Açúcares, proteínas e aminoácidos solúveis totais	62
5.3.1.3	Fatores climáticos	65
5.3.2	Metabolismo secundário	65
5.3.2.1	Teor, rendimento e composição química do óleo essencial	65
5.3.2.2	Análises dos Componentes Principais (PCA)	71
5.3.2.3	Teor de polifenóis totais, flavonóides totais e cromatografia do extrato hidroalcoólico	74
5.3.2.4	Atividade enzimática	81
5.3.2.5	Atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico	83
5.3.2.6	Fatores climáticos	85
5.4	Correlação de Pearson	87
5.5	Considerações finais	91
6	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXOS	111
	ANEXO A – Exsicata da espécie utilizada (<i>Achillea millefolium</i> L.)	111
	ANEXO B – Croqui do experimento	112

1 INTRODUÇÃO

A comercialização de plantas medicinais vem crescendo nos últimos anos e gerando alternativas de fonte de renda para a agricultura familiar. Um elemento fundamental a ser considerado no cultivo de espécies medicinais é a necessidade de se associar uma máxima produção de biomassa das plantas ao máximo rendimento da substância ativa, permitindo que a matéria-prima proveniente destas plantas seja comercializada tanto em termos de quantidade como de qualidade.

A asterácea *Achillea millefolium* L., conhecida por mil-folhas, é uma espécie utilizada na medicina popular contra várias doenças, incluindo inflamações da pele e distúrbios gastrointestinais e hepatobiliares (BENEDEK; KOPP, 2007). Além do seu uso na medicina tradicional, esta espécie é empregada como matéria prima nas indústrias de fitomedicamentos e de bebidas nutracêuticas (BENEDEK; KOPP, 2007). A mil-folhas pode desempenhar um papel importante como alimento funcional, ao ser consumida na forma de chás como parte da dieta, produzindo assim benefícios específicos à saúde, tais como a redução do risco de diversas doenças e manutenção do bem-estar físico e mental (MORAES; COLLA, 2006).

O ácido salicílico (AS) é um composto fenólico amplamente presente nos vegetais. O AS está relacionado a diferentes processos fisiológicos da planta, atuando como regulador de crescimento e como um elicitador abiótico capaz de aumentar a síntese de compostos secundários de interesse comercial. Neste contexto, a aplicação de AS pode melhorar o desempenho produtivo e a biossíntese de compostos secundários em plantas medicinais, constituindo-se em uma tecnologia com grande potencial de incorporação ao manejo técnico destas culturas. Entretanto, para viabilizar a recomendação de uso de substâncias elicitoras em cultivos comerciais tornam-se necessários testes em diferentes ambientes e concentrações, pois, tanto espécies distintas como partes diferentes da planta podem apresentar respostas variadas ao elicitador.

Um dos mecanismos de ação do AS na promoção de aumento da síntese de compostos secundários em plantas é explicado pelo efeito direto deste composto sobre a expressão gênica, ocasionando um aumento na atividade de enzimas chaves das vias metabólicas secundárias. Entretanto, estudos recentes têm levantado a hipótese de que a ação elicitoras do AS em plantas pode ocorrer também

de maneira indireta, via alteração do metabolismo primário (BROECKLING et al., 2005). Esta afirmação se baseia no fato de que diversas substâncias produzidas pelo metabolismo primário da planta (carboidratos, proteínas e aminoácidos solúveis totais) são empregadas como precursoras das vias metabólicas de terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, ocorrendo, portanto, uma ligação entre os metabolismos primário e secundário. Desta forma, a ação elicitora do AS poderia ser explicada pelo efeito indireto de aumento da concentração de metabólitos primários nas plantas tratadas, ocorrendo um reparcelamento das fontes de carbono que favorece as vias biossintéticas de produção dos compostos secundários, refletindo diretamente na produção de metabólicos com maior potencial antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o efeito da aplicação foliar de AS em plantas de mil-folhas cultivadas a campo em diferentes fases fenológicas sobre a produção de biomassa (efeito hormonal) e a síntese de compostos primários e secundários (efeito elicitor) e determinar o potencial antioxidante do extrato obtido de mil-folhas cultivadas a campo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar parâmetros biométricos de crescimento.
- Avaliar os teores totais de açúcares solúveis, aminoácidos totais e proteínas totais.
- Avaliar quantitativa e qualitativamente os teores de óleo essencial, fenóis totais e flavonóides totais.
- Verificar correlação entre o aumento dos teores de compostos primários com o aumento do teor de compostos secundários.
- Verificar correlação entre os teores de compostos fenólicos totais com o aumento da atividade das enzimas chaves da via de produção dos mesmos, sendo elas a fenilalanina amônia-liase (PAL) e a chalcona sintase (CHS).
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato foliar das plantas tratadas com AS, por meio dos testes *in vitro* de supressão de radical livre estável (DPPH), teste FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), teste do óxido nítrico e teste de peroxidação lipídica TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Species).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos da cultura

3.1.1 *Achillea millefolium* (Linnaeus, 1753)

A espécie medicinal *Achillea millefolium* L. (mil-folhas), pertence à família Asteraceae que é a maior família de plantas e compreende cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies (ANDENBERG et al., 2007). No Brasil, a família é representada por, aproximadamente, 290 gêneros e 2.097 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetacionais (FLORA DO BRASIL 2020, 2018). A mil-folhas é nativa da Europa, América do Norte, Sul da Austrália e Ásia. Trata-se de uma espécie herbácea, perene, rizomatosa de 30 - 50 cm de altura, considerada uma planta de dia longo com fotoperíodo crítico entre 12 e 16 horas a 18 °C. Possui folhas compostas finamente pinadas com folíolos de 5 a 8 cm de comprimento e flores brancas, presentes em capítulos reunidos em uma panícula terminal. Multiplica-se por estacas e por divisão da touceira (LORENZI, 2001).

A *Achillea millefolium* é utilizada na medicina tradicional no tratamento de distúrbios gastrointestinais e hepatobiliares e externamente no caso de inflamações da pele e cicatrização de feridas (WILLUHN, 2002; BAYTOP, 1999).

Além de óleos essenciais, sesquiterpenos e compostos fenólicos, como flavonóides e ácidos fenólicos carbônicos que são um grande grupo de componentes presentes em plantas de mil-folhas (BENEDEK; KOPP; MELZIG, 2007), destaca-se a presença de óleo essencial com terpenos (cineol, borneol, pinenos, cânfora, azuleno) e derivados terpênicos e sesquiterpênicos (FIERASCU et al., 2015), como também taninos, mucilagens, cumarinas, resinas, saponinas, esteróides, ácidos graxos, alcaloides (CORRÊA; BATISTA; QUINTAS, 2003) e princípio amargo (MARTINS et al., 2000). Em suas flores e folhas relata-se a presença dos flavonóides apigenina, luteolina e os seus glicosídeos, artemetina e rutina (ALI; GOPALAKRISHNAN; VENKATESALU, 2017). Os flavonóides e seus heterosídeos estão relacionados com a atividade antiespasmódica (ALI; GOPALAKRISHNAN; VENKATESALU, 2017). Devido à sua elevada solubilidade em água e etanol, essas substâncias polares são completamente extraídas em chás e tinturas que são as formas de aplicação tradicional desta espécie.

A *Achillea millefolium* L. é uma das espécies listadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), sendo amplamente utilizada pela população brasileira. No entanto, são necessários mais estudos para se determinar as condições de crescimento e de produção agrícola, segurança, eficácia e definições da forma farmacêutica mais adequada (BRASIL, 2009).

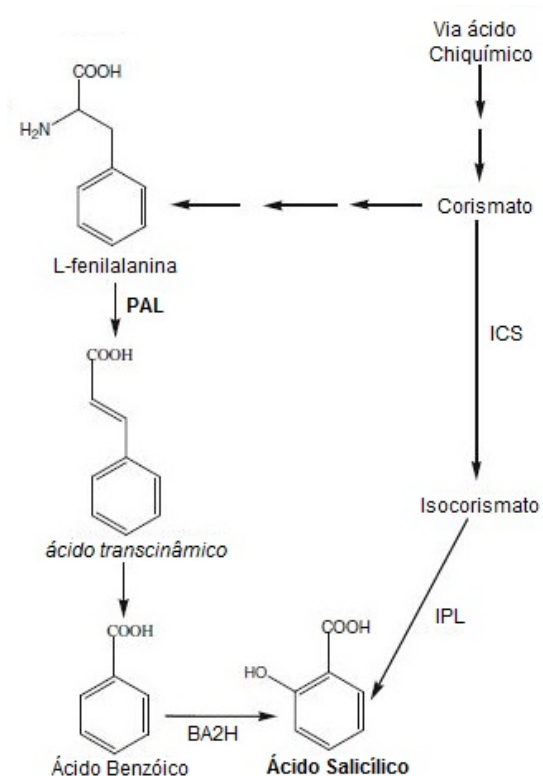
No Brasil, o Estado do Paraná apresenta produção comercial desta espécie com fins fitoterápicos. O ciclo médio de desenvolvimento da mil-folhas se dá em 4 meses (120 dias), sendo possível a realização de três a quatro colheitas da cultura por ano. O plantio é realizado em abril ou junho, adotando-se o espaçamento de 70 x 50 cm é possível plantar 28 mil mudas por hectare, com produção de 2336 kg de matéria verde (83,43 gramas por planta). De cada 100 kg de matéria verde pode-se obter 1 kg de óleo essencial, portanto a produção aproximada de óleo essencial de mil-folhas é de 23,36 kg de óleo por hectare (NETTO; RAFFAELLI, 2004).

3.2 Ácido salicílico: efeitos sobre processos fisiológicos da planta e atenuação de estresses biótico e abióticos

O AS é um composto fenólico de natureza hormonal derivado do ácido benzóico e relacionado à aspirina. O AS tem sido relatado como causador de uma grande variedade de efeitos sobre a morfologia e fisiologia de plantas (TUNA et al., 2007) e como indutor de mecanismo de proteção no aumento de resistência a estresses bióticos e abióticos (HERNÁNDEZ-RUIZ; ARNAO, 2018). O AS ocorre naturalmente em plantas em quantidades muito baixas (KHANDAKER; AKOND; OBA, 2011).

Para a síntese do AS em plantas foram propostas duas vias, a primeira indica a via fenilalanina → ácido transcinâmico → ácido benzóico → ácido salicílico. A segunda via, aponta a sequência do ácido corismato → isocorismato → ácido salicílico (MÉTRAUX, 2002; BANDURSKA, 2013), como apresenta a Figura 1. Ambas as vias diferem em sua localização na célula; enquanto a primeira envolve cloroplastos e peroxissomos, a segunda é essencialmente cloroplástica (RASKIN, 1992).

Figura 1 - Esquema das vias biossintéticas do ácido salicílico.



Abreviaturas: PAL – fenilalanina amônia liase, ICS – isocorismato sintase, IPL- isocorismato piruvato liase e BA2H - ácido benzóico 2 hidroxilase.

Fonte: (BANDURSKA, 2013)

O AS atua como um importante regulador de diversos processos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Entre esses efeitos estão a tolerância da planta ao calor (DAT et al., 2000), geadas (JANDA et al., 2014), a indução da floração em espécies herbáceas (HEGAZI; EL-SHRAYI, 2007), a estimulação do desenvolvimento da raiz, o fechamento dos estômatos e a redução da transpiração (SINGH; USHA, 2003) e a regulação da síntese de clorofilas, carotenóides e fotossíntese (LIU et al., 2011).

A aplicação foliar de AS e ácido jasmônico (AJ) em plantas de tomate apresentaram efeitos positivos no crescimento, florescimento, rendimento e qualidade do fruto nas dosagens aplicadas isoladamente $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de AS e $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ AJ como em combinação ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de AS + $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ AJ) (KAZEMI, 2014).

Efeitos positivos do AS no crescimento das raízes e biomassa total de plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) e os resultados indicaram que o AS ($0,001$

mmol L⁻¹) favoreceu o enraizamento e o peso fresco, bem como a altura e peso fresco da biomassa total (HAAS; GONZÁLEZ; SAAVEDRA, 2015).

Aumentos na atividade da catalase (CAT) e peroxidase (POD), como também os teores de clorofilas *a* e *b*, foram evidenciados em plantas de milho tratados com 1,2 g L⁻¹, enquanto que a concentração de 0,6 g L⁻¹ resultou em aumento no conteúdo de carotenoides (SALLAM; IBRAHIM, 2015).

O papel do AS nos mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos tem sido bem documentado (YALPANI et al., 1994; HORVÁTH et al., 2007). O AS atua como indutor da resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (IRS) que são fenômenos distintos, mas fenotipicamente semelhantes, através da qual são induzidos e desencadeados e governados por mecanismos bioquímicos diferentes (MÉTRAUX, 2002). Entretanto, a resistência local é chamada de reação de hipersensibilidade, ocorrendo um rápido acúmulo no local da infecção durante o ataque de patógenos e ocasionando a reação de hipersensibilidade em plantas. Este composto se espalha para outras partes da planta para induzir uma vasta gama de respostas de defesa (KERBAUY, 2008). Esse processo é desencadeado quando um sinal externo (elicitador) se liga a um possível receptor na superfície da célula vegetal e através dele o sinal primário é transmitido para o interior da célula, ativando desta forma, os mensageiros secundários (BARROS et al., 2010).

Outra importante função do AS nas plantas está relacionada à mitigação de estresses abióticos. A ação atenuadora ocorre pela prevenção de dano oxidativo celular via aumento da atividade de enzimas antioxidantes (AGARWAL et al. 2005, JOSEPH; JINI; SUJATHA, 2010), além da diminuição da peroxidação de lipídios da membrana celular (GUNES et al. 2007). Neste sentido, a aplicação exógena de AS tem sido testada em diferentes culturas agrícolas, investigando-se a capacidade do mesmo em mitigar os efeitos adversos de estresse, induzindo a resistência em planta de trigo e milho à salinidade (SAKHABUTDINOVA et al, 2003; SHAKIROVA et al, 2003), estresse osmótico em trigo (BHUPINDER; USHA, 2003), estresse de metal pesado em arroz (MISHRA; CHOUDHURI, 1999), estresse hídrico em lentisco-bastardo (*Phillyrea angustifolia* L.) (MUNNÉ-BOSCH; PEÑUELAS, 2003) e tem um papel no controle da expressão gênica (HERRERA-VÁSQUEZ; SALINAS; HOLUIGUE, 2015). A maioria dos genes regulados por AS são genes

relacionados com a resposta de defesa das plantas a estresses bióticos e abióticos. Portanto, o AS pode alterar os teores de metabólitos secundários nas plantas.

Seis genótipos de funcho (*Foeniculum vulgare*) foram estudados, sendo submetidos a déficit hídrico em dois níveis de irrigação (irrigação após o esgotamento de 35 e 75% da água disponível no solo) e três níveis de AS (0; 0,5 e 1,0 mM). Os resultados indicaram que a pulverização foliar com 0,5 mM de AS não só afetou positivamente o potencial hídrico, conteúdo relativo de água, concentração de prolina, teores de clorofila, carotenoides e óleo essencial, como também mudou significativamente as atividades de enzimas antioxidantes, aumentando a resistência do funcho à seca (ASKARI; EHSANZADEH, 2014).

Genótipos de gergelim sob déficit hídrico temporário durante o crescimento inicial tratados com AS, apresentaram redução nos efeitos nocivos do estresse hídrico sobre o crescimento das plantas. O genótipo CNPA-G3 apresentou maior tolerância ao déficit hídrico e melhor resposta ao AS na fase de crescimento inicial (CARNEIRO et al., 2015).

A aplicação do AS minimiza os danos induzidos pelo estresse salino na germinação de sementes de milho, favorecendo sua porcentagem de germinação em altas concentrações de NaCl no substrato de até 90 mmol L⁻¹, no entanto, acima dessa concentração, o AS não é capaz de manter o vigor das sementes (TONEL et al., 2013).

Concentrações entre 0,1 e 0,5 mmol L⁻¹ de AS promoveram aumento da atividade fotossintética em plantas de feijão-mungo (*Vigna radiata*) submetidas a estresse salino, as quais apresentaram crescimento evidenciado na concentração de 1,0 mmol L⁻¹ de AS (NAZAR et al., 2011). Aplicação de 0,1 mmol L⁻¹ de AS alivia o estresse salino em pepinos sob condições moderada de nitrogênio, melhorando a capacidade das plantas para regular os níveis endógenos de AS após o estresse salino quando cultivadas sob condições adequadas de nutrientes (KIM; KIM. SHIM, 2017).

A aplicação do AS em orquídea (*Dendrobium officinale*) sob estresse frio, apresentou proteção a membrana do cloroplasto e a proteína D1, além de aumentar a capacidade antioxidante das plantas, sendo benéfico para o crescimento da recuperação das mudas (HUANG et al., 2015).

3.3 Ácido Salicílico: atuação como elicitor do metabolismo secundário

Os elicitores são produtos de origem biótica ou abiótica que, quando aplicados em plantas, induzem a expressão de genes que codificam diversas respostas de defesa do vegetal, podendo ter efeitos diferentes sobre uma mesma espécie. É importante considerar também o tipo de elicitor a ser utilizado (RODRIGUES-BRANDÃO et al., 2014). A elicitação causa uma variedade de reações defensivas e o acúmulo de metabólitos secundários (YUKIMUNE et al., 1996; ZHANG et al., 2004), portanto a aplicação exógena de elicitores tem sido considerada como uma estratégia adequada para a maior obtenção de compostos de interesse.

O AS induz a expressão de genes relacionados à produção de algumas classes de metabólitos secundários em plantas (TAGUCHI et al., 2001), tais como terpenos, alcaloides, flavonóides, compostos fenólicos e fitoalexinas (SILVA et al., 2014), tanto em espécies vegetais medicinais como espécies categorizadas como alimentos funcionais.

O AS pode exercer seu efeito elicitor via alteração da expressão gênica de enzimas chave da via de produção de compostos fenólicos (CHEN et al., 2006), tais como a fenilalanina amônia-liase (PAL), a chalcona sintase (CHS) e a chalcona isomerase (CHI), aumentando a atividade destas enzimas. O AS também é um regulador das enzimas antioxidantes tais como SOD (superóxido dismutase) e POD (peroxidase), que, juntas, aumentam a tolerância da planta a estresses ambientais (MUTLU; ATICI; NALBANTOGLU, 2009).

Pesquisas recentes sugerem que espécies reativas de oxigênio (EROS) podem atuar como sinalizadores celulares associados com a expressão gênica e atividade da PAL e CHS, desta forma, ocorrendo acúmulo de compostos fenólicos e flavonóides em plantas (JACOBO-VELÁZQUEZ et al., 2011; GHASEMZADEH, JAAFAR; KARIMI, 2012).

Aplicações exógenas de AS foram eficazes em induzir a formação de metabólitos secundários em cultura de células de plantas e em plantas vivas (KIDDLE; DOUGHTY; WALLSGROVE, 1994). Mas, existe grande interesse na aplicação das substâncias elicitoras em plantas intactas, o que tornaria possível a utilização desta técnica em cultivos comerciais de grande escala.

Concentrações de AS (6,25 e 22,5 mg L⁻¹) induziram o acúmulo de compostos fenólicos em cultura de células de *Salvia miltiorrhiza*. O efeito indutor do AS no acúmulo de compostos fenólicos correlacionou-se com a atividade da PAL, mas não com a atividade de TAT (Tirosina aminotransferase) que é a primeira enzima na via derivada da tirosina para a biossíntese do ácido rosmarínico. A atividade da PAL induziu ao aumento da quantidade de compostos fenólicos (DONG; WAN; LIANG, 2010).

A aplicação foliar de AS (0,01 e 1,0 mmol L⁻¹) em duas variedades de gengibre (*Zingiber officinale*) (Halia Bentong e Halia Bara), demonstrou que o AS aumentou a atividade da enzima CHS e a síntese de flavonóides nos rizomas (GHASEMZADEH; JAAFAR; KARIMI, 2012).

Aumentos nos teores de ácido rosmarínico e nos níveis de compostos fenólicos, bem como uma maior atividade antioxidante avaliada pelos testes de DPPH, FRAP e ABTS⁺, foram evidenciados em plantas de tomilho (*Thymus membranaceus*) após aplicação de AS (PÉREZ-TORTOSA et al., 2012).

O efeito hormonal do AS foi evidenciado em plantas de mil-folhas (*Achillea millefolium* L.), apresentando aumentos na massa de matéria seca de raízes, clorofila *a* e clorofila total na concentração de 0,50 mmol L⁻¹. O efeito elicitor foi obtido com as aplicações de 0,50 e 1,0 mmol L⁻¹ de AS, aumentando a produção de compostos secundários, tais como fenóis totais e óleo essencial e aumento na atividade antioxidante do extrato vegetal (GORNI; PACHECO, 2016).

Estudos demonstram que a aplicação de AS em planta de funcho (*Foeniculum vulgare*) apresentaram aumentos nos parâmetros de crescimento, fisiológicos e bioquímicos, como também, os atributos de rendimento e qualidade de óleo essencial (HASHMI et al. 2012) e aumento na atividade antioxidante (GORNI et al., 2017).

Entretanto, em alguns estudos sobre a utilização de elicitores visando aumento do metabolismo secundário, tais como extrato de leveduras e metil jasmonato (MeJ), foram observadas alterações marcantes nos níveis de metabólitos primários, tais como diversos aminoácidos, ácidos orgânicos e carboidratos (BROECKLING et al., 2005). Isto sugere que o mecanismo de elicitação pode ser atribuído mais a um efeito indireto de mudanças no “pool” de metabólitos primários, com um conseqüente reparcelamento das fontes de carbono que favorece o

metabolismo secundário, do que a simples indução de enzimas chave das vias biossintéticas secundárias.

As vias metabólicas secundárias são amplamente derivadas das vias primárias, desde que metabólitos primários atuem como substratos críticos para as vias metabólicas secundárias (KESSMANN et al., 1990). Por exemplo, a molécula precursora no metabolismo de fenilpropanóides é o aminoácido fenilalanina. Além disso, diversos cofatores essenciais e ligantes envolvidos no metabolismo primário são necessários para a ocorrência das vias biossintéticas do metabolismo secundário, e estes cofatores são também sintetizados a partir de metabólitos primários (BROECKLING et al., 2005). Um destes exemplos é a Coenzima A (CoA), um componente essencial em ambas as reações metabólicas, primárias e secundárias. A regulação de enzimas utilizando CoA ou os seus tioésteres é frequentemente afetada pela indução do metabolismo secundário (LOGEMANN et al., 2000).

Sugere-se que esta “reprogramação” metabólica induzida por substâncias elicitoras seja uma resposta genérica das plantas, com tendência de apresentar similaridade em relação aos grupos de metabólitos envolvidos, independentemente do elicitor utilizado (BROECKLING et al., 2005). Especificamente, quando o teor de sacarose é reduzido, ocorrem aumentos de aminoácidos de cadeia ramificada e dos níveis de beta-alanina. Além disso, essas mudanças representam a repartição de carbono a partir do metabolismo primário (especificamente sacarose) para o metabolismo secundário, com aumento dos teores de saponinas, triterpenos e isoflavonóides. Tem sido especulado que elevadas cadeias ramificadas de aminoácidos, putrescina, GABA e beta-alanina, coletivamente, representam uma alteração na biossíntese da CoA. Este padrão de resposta à elicitação é parcialmente relacionado com o metabolismo secundário (BROECKLING et al., 2005).

3.4 Propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos

Há milhões de anos as plantas terrestres evoluíram e começaram a produzir metabólitos secundários como uma forma de defesa contra estresses bióticos e abióticos (VRIES; ARCHIBALD, 2018). Os compostos fenólicos são biossintetizados durante os processos fotossintéticos, apesar de não estarem

diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução, como os compostos primários (carboidratos, clorofilas, lipídios e proteínas). Porém são importantes para a sobrevivência das plantas (VERMA; SHUKLA, 2015; OCHOA-VELASCO et al., 2017).

Existem três grupos de agentes fitoquímicos mais importantes que são: os terpenos, biossintetizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto); os compostos nitrogenados que são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) e por fim, os compostos fenólicos, derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os compostos fenólicos apresentam, em sua estrutura, vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas (o fenol) (BURNS et al., 2001; MELO; GUERRA, 2002). Esta classe de compostos apresentam uma grande diversidade e são representados por dois grupos, os flavonóides e não-flavonóides (SILVA et al., 2010). Estes compostos incluem: fenóis simples e outros glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados dos ácidos benzoico e cinâmico, a-pirones (cumarinas e isocumarinas), ligninas, flavonoides (flavononas, antocianinas e catequinas) e quinonas (STANGARLIN et al., 2011).

Os compostos fenólicos são sintetizados a partir de diferentes rotas, portanto, constituem um grupo heterogêneo do ponto de vista metabólico (TAIZ; ZEIGER, 2013). São duas as vias metabólicas envolvidas na produção dos fenóis: a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico. Porém, a via do ácido chiquímico e cinâmico (fenilpropanóides) constitui a sequência comum que gera os diferentes grupos de polifenóis e lignina (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os compostos fenólicos e flavonóides estão entre os produtos secundários mais influentes e amplamente distribuídos no reino vegetal (ALI; ABBAS, 2003) e desempenham importantes papéis fisiológicos e ecológicos, estando envolvidos na resistência a diferentes tipos de estresse (BETTAIEB et al., 2011; VERMA; SHUKLA, 2015). São considerados compostos biologicamente ativos (fontes de antioxidantes naturais), capazes de interferir a nível molecular no organismo. Desta forma, tem aumentado o interesse desses compostos nos alimentos, devido a ação benéfica na manutenção da saúde humana (SILVA et al.,

2010; MARTINS; PETROPOLUS; FERREIRA, 2016; WINK, 2016). Os compostos fenólicos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que podem retardar ou inibir a oxidação de outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações oxidativas em cadeia (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; ORIAN; ESCRICHE, 2015).

O potencial antioxidante dos compostos fenólicos depende do número e arranjo dos grupos hidroxila nas moléculas de interesse (ACHAKZAI et al., 2009; VERMA; SHUKLA, 2015), com propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um papel importante na absorção e neutralização de radicais livres (ASIMI; SAHU; PAL, 2013; TAGHVAEI; JAFARI, 2015).

3.5 Estresse oxidativo e antioxidantes naturais

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio no organismo humano. Há um aumento significativo do potencial de redução no organismo, devido a um aumento na produção de compostos químicos com elevado grau de reatividade. A contenção desses compostos através de sistemas biológicos, neutralizando-os ou reparando danos por eles gerados, não é suficiente. Esses compostos são principalmente representados por duas classes de radicais livres (RL), sendo elas as espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (NRS). O desequilíbrio entre a produção de RL e as defesas do organismo gera uma condição que pode promover desordens que provocam e contribuem tanto no processo de envelhecimento, como também nas complicações biológicas, incluindo inflamação crônica, doenças neurodegenerativas e até mesmo diabetes (ROESLER et al., 2007).

No que diz respeito à origem dos RL no organismo humano, existem os de fonte endógena, os quais são produzidos pelo metabolismo normal e os de fonte exógena, os quais são originados devidos à inalação e radiações, principalmente as solares (TROUBA et al., 2002; ROESLER et al., 2007).

Pesquisas vêm demonstrando que antioxidantes de origem vegetal têm muita importância nesse contexto, com destaque para compostos fenólicos, reduzindo ou até mesmo eliminando os efeitos deletérios dos processos oxidativos, podendo assim ser intensivamente empregados na indústria de alimentos e

farmacológica (BIANCHI; ANTUNES, 1999; ROESLER et al., 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em condições de campo, em área experimental localizada no Horto de Plantas Medicinais da UNOESTE – Campus II, Presidente Prudente/SP, a uma latitude de 22° 07' 04" S e longitude de 51° 27' 05" W, altitude de 432 metros acima do nível do mar. Segundo Köppen, o clima da região é caracterizado como Aw mesotérmico, com verões quentes e invernos secos. O solo classificado como Argissolo Vermelho Distrófico com 16% de argila na camada de 0 – 5 cm (EMBRAPA, 2006). Os experimentos foram conduzidos em dois anos consecutivos (2016 e 2017).

Amostras de solos foram coletadas nas camadas de 0 – 0,20 e 0,20 – 0,40 m e submetidas à análise química de acordo com Raij et al. (2001), cujos resultados são apresentados na Tabela 1. O solo da área experimental foi corrigido conforme recomendações do Boletim 100 - IAC para espécies herbáceas perenes, aplicando-se calcário para elevação da V% a 80 (0,55 ton ha⁻¹) e adubação orgânica a base de esterco bovino curtido (100 ton ha⁻¹) (aplicando-se 10 kg de esterco por metro quadrado de canteiro, quantidade essa maior do que a recomendada por se tratar de um solo arenoso). Foi realizada a coleta dos dados meteorológicos durante o período experimental para os anos de 2016 e 2017 (desde o plantio em 01 de maio até a colheita em 01 de setembro, de acordo com o ciclo da cultura).

Tabela 1 – Análise química do solo utilizado no experimento.

Anos	Amostras (m)	pH	M.O.	H+Al	Ca	Mg	K	P
		CaCl ²	g dm ⁻³		mmol _c dm ⁻³		mg dm ⁻³	
2016	0 - 20	5,2	7,4	12,8	9,3	3,5	1,6	17,0
	20 - 40	5,2	4,8	12,9	8,5	3,7	1,7	15,6
2017	0 - 20	6,0	9,2	11,6	22,4	10,3	2,4	9,9
	20 - 40	5,6	6,6	12,2	12,8	6,3	2,5	40,6

Em ambos os anos de cultivo, foram utilizadas mudas matrizes de mil-folhas (*Achillea millefolium* L.) provenientes do Horto de Plantas Medicinais de Itapeva/SP (Cooperativa Coopplantas), cujas exsiccatas estão depositadas no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU - MG) HUFU 74428 (Anexo A). As mudas foram propagadas por divisão da touceira e plantadas em saquinhos plásticos (12 x 25 cm) com solo incorporado com esterco bovino para formação das mesmas. Após o período de formação (30 dias), foi realizado o plantio das mudas

em canteiros com cobertura vegetal (palhada de braquiária). O espaçamento adotado foi de 70 x 50 cm, de acordo com Netto e Raffaelli (2004) e as mudas foram irrigadas 2 vezes ao dia às 8 e as 16 horas.

Estudos anteriores revelaram a ação hormonal e elicitora do AS na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em plantas de mil-folhas em ambiente controlado (GORNI; PACHECO, 2016). Com a finalidade de observar se os efeitos positivos obtidos em plantas envasadas seriam repetidos na condição natural de cultivo, foi realizada a aplicação de AS em mil-folhas em condições de campo, afim de validar esta tecnologia no sistema de produção comercial desta espécie medicinal.

Os tratamentos foram constituídos da seguinte maneira:

- T1 – controle (plantas pulverizadas apenas com água);
- T2 – aplicações de AS na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ aos 20, 60 e 100 dias após o plantio (DAP);
- T3 – aplicações de AS na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ somente aos 100 DAP, pulverizando-se as plantas durante 3 dias consecutivos.

As aplicações foram distribuídas em diferentes fases de crescimento das plantas e em aplicações consecutivas, a fim de garantir os efeitos do AS nas plantas de mil-folhas mesmo em um ambiente de campo, apresentando fatores de interação múltipla.

O ácido salicílico, na formulação pó (Sigma Aldrich, PM 138,1 g), foi pesado (0,6905 g) em balança analítica, diluído em 10 mL de álcool etílico absoluto e finalmente dissolvido em 5 L de água. A pulverização foi realizada em toda a parte aérea das plantas aplicando-se 1 L por canteiro (50 mL por planta), através de pulverizador pressurizado a CO_2 (40 PSI), utilizando-se o espalhante comercial Agral® (nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol) na proporção de $50 \mu\text{L L}^{-1}$ de solução.

A colheita constou de apenas um corte, efetuado aos 120 dias após o plantio das mudas no campo. Foram colhidas as 6 plantas centrais de cada parcela (área útil). Foram coletadas 5 folhas de cada planta e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises enzimáticas e de pigmentos fotossintéticos. Todas as partes da planta (raiz e folhas) foram colocadas para secar separadamente, em estufa com circulação de

ar à temperatura de 40°C até a obtenção de peso constante, para a determinação da massa de matéria seca de folhas (48h) e raízes (72h).

O delineamento experimental adotado foi o de blocos inteiramente casualizados, numa área total de 273,80 m². Cada parcela (10,50 m²) constou com cinco linhas de quatro plantas, totalizando 20 plantas por parcela em 5 repetições (blocos) em 3 tratamentos (15 parcelas e 300 plantas no total), de acordo com o croqui (Anexo B). Adotou-se o arranjo fatorial 3 x 2, formado pelos fatores “época de aplicação” (controle; aplicação aos 20, 60 e 100 DAP e aplicação aos 100 DAP) e “ano de cultivo” (2016 e 2017).

Todos os parâmetros biométricos e bioquímicos foram avaliados aos 120 dias após o plantio, nas 6 plantas colhidas por parcela.

4.1 Parâmetros biométricos avaliados:

4.1.1 Área foliar (cm²) (AF): avaliação por método destrutivo, utilizando medidor portátil de área (modelo LI - 3000A, LI-COR, USA).

4.1.2 Número de folhas por planta (NF): determinação por contagem manual, sendo consideradas as folhas totalmente expandidas.

4.1.3 Massa de matéria seca de folhas, raízes e total (g planta⁻¹): as folhas e raízes foram colocadas para secar separadamente, em estufa com circulação de ar à temperatura de 40°C (folhas), obtendo-se seu peso constante em 48 horas e 60°C (raízes) obtendo-se seu peso constante em 72 horas.

4.1.4 Razão Raiz / Parte Aérea (RPA): foi realizada uma análise de partição de biomassa pela relação entre a massa de matéria seca da raiz (MSR) e massa de matéria seca de folhas (MSF) (BENINCASA, 2003).

$$RPA = \frac{MSR}{MSF}$$

4.1.5 Razão de Área Foliar (RAF): a razão de área foliar expressa a área foliar útil para fotossíntese (BENINCASA, 2003), a qual foi obtida a partir de valores

instantâneos da área foliar (AF), responsável pela interceptação de energia luminosa, e massa de matéria seca total (MST), resultado da fotossíntese, segundo a equação:

$$\text{RAF (cm}^2 \text{ g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{AF}}{\text{MST}}$$

4.1.6 Área Foliar Específica (AFE): relaciona a superfície da folha com a massa da própria folha, significando a disponibilidade de área foliar em cada grama de folha (indicador de espessura foliar) (OLIVEIRA; MESQUITA; FREITAS, 2002), de acordo com a equação:

$$\text{AFE (cm}^2 \text{ g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{AF}}{\text{MSF}}$$

4.1.7 Razão de Massa Foliar (RMF): Representada pela fração de matéria seca produzida pela fotossíntese que não é utilizada na respiração nem exportada para outras partes da planta, ficando retida nas folhas. É determinada por um cálculo adimensional (OLIVEIRA; MESQUITA; FREITAS, 2002), seguido pela equação:

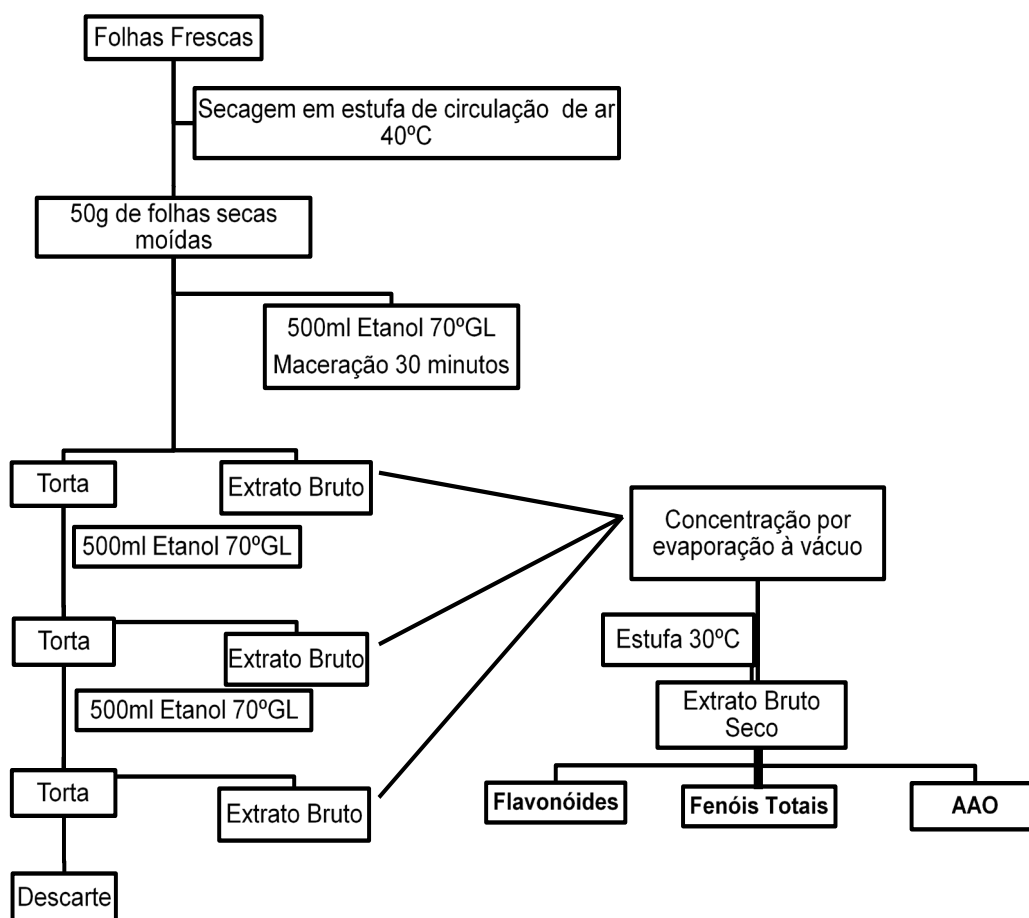
$$\text{RMF} = \frac{\text{MSF}}{\text{MST}}$$

4.2 Preparo do extrato hidroalcoólico de *Achillea millefolium* L.:

As determinações do teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e da atividade antioxidante (DPPH, FRAP, TBARS e NO) foram realizadas a partir da obtenção do extrato hidroalcoólico. As folhas de *A. millefolium* L. foram secas em estufa a 40°C e trituradas em liquidificador. Uma massa de 50 g de folhas secas e trituradas foi submetida à extração com 1,5 L de etanol 70°GL durante um período de 30 minutos, sob temperatura ambiente e abrigo da luz. O processo de maceração e filtração do sobrenadante foi realizado em três etapas (M1, M2 e M3) e após 30 minutos de maceração foi retirado apenas o solvente, mantendo-se a massa de folhas, repondo o solvente após completa filtração (mantendo sempre a

massa de folhas úmida). Os extratos brutos obtidos foram reunidos e concentrados por evaporação à vácuo, sendo em seguida obtido o extrato bruto hidroalcoólico seco, após secagem em estufa de circulação de ar à 30°C (SIMÕES et al., 2007), como apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma da obtenção do extrato hidroalcoólico de folhas de *Achillea millefolium* L. por maceração.



Fonte: O Autor (2018).

4.3 Parâmetros bioquímicos avaliados:

Para todos os parâmetros avaliados, foram utilizadas 5 repetições biológicas.

4.3.1 Teor de macronutrientes foliar:

As amostras de folhas enviadas ao laboratório, foram submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C, até peso constante, e após a secagem, o material foi submetido à moagem, em moinho tipo Wiley com malha de 20 mesh (0,85 mmol L⁻¹). Os teores de N, P, K, Ca, Mg e S foram determinados conforme métodos descritos por Malavolta; Vitti e Oliveira (1997). Os teores de macronutrientes foram expressos em g kg⁻¹.

4.3.2 Teor de pigmentos foliares (clorofilas, carotenóides e antocianinas):

A extração de clorofila seguiu o método de Wellburn (1994). Foram pesadas 0,06 g de tecido foliar congelado. Acrescentou-se 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) neutralizado com carbonato de cálcio 5% (m/v), sendo os tubos incubados em banho-maria à 65°C por 1 hora. Após esse tempo, os tubos foram colocados no escuro para esfriarem até atingirem temperatura ambiente. Depois deste processo, os sobrenadantes foram reunidos e realizou-se as leituras em espectrofotômetro (665, 649 e 480 nm), usando o DMSO bruto como branco. As análises foram realizadas em triplicata.

Os valores foram submetidos aos cálculos ($\mu\text{g L}^{-1}$):

$$\text{Clorofila } a = 12,47 \times (A665) - 3,62 \times (A649)$$

$$\text{Clorofila } b = 25,06 \times (A649) - 6,54 \times (A665)$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

$$\text{Carotenóides} = \frac{(1000 \times (A480) - 1,29 \times (Cl\ a) - 53,78 \times (Cl\ b))}{220}$$

As antocianinas foram determinadas de acordo com o método de Francis (1982), no qual 1 g de massa fresca foi adicionado à solução extratora etanol 95% acidificado com HCl (1,5 N) na proporção de 85:15. O conteúdo foi homogeneizado por 2 min e transferido para balão volumétrico de 50 mL, aferindo com a solução extratora. O balão volumétrico foi envolvido por papel alumínio e ficou em repouso na geladeira por 24h. Após o repouso o extrato foi filtrado para Becker de 50 mL envolvido com papel alumínio e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em 535 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

As antocianinas foram quantificadas com base nas equações abaixo:

$$\text{Antocianinas } (\mu\text{g} / 100 \text{ g}) = \left(\frac{\text{Abs} \times V \times 10^3}{982 \times L \times m} \right) \times 1000$$

Onde, Abs = absorvância (535 nm), V = volume de extração (L), L = caminho óptico da cubeta (cm), m = massa da amostra (g).

4.3.3 Teor de açúcares solúveis totais (mg g⁻¹):

Foram pesados 100 mg de tecido vegetal seco e adicionados 4 mL de etanol 80%, durante 15 min, seguindo-se centrifugação a 5000 rpm, pelo tempo de 10 min. O sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspenso em 3 mL de etanol 80%, por duas vezes. Após a junção dos sobrenadantes, o volume foi aferido com água destilada para 10 mL.

Pipetou-se 500 µL dos extratos das amostras, para diferentes tubos de ensaio, acrescentando-se em cada tubo 500 µL de fenol a 5%. Após agitação, adicionou-se 2,5 mL de ácido sulfúrico (98N) e os tubos foram agitados novamente e ficaram em repouso até entrarem em equilíbrio com a temperatura ambiente. As leituras foram efetuadas a 490 nm (DUBOIS et al. 1956). Para a elaboração da curva analítica, foi utilizado a D-glicose nas concentrações de 20 a 100 mg L⁻¹ diluída em água destilada. As análises foram realizadas em triplicata.

$$\text{Açúcares solúveis totais} = \left(\frac{\text{Absorbância} \times K \times \text{Fator de diluição}}{\text{Peso seco}} \right)$$

Onde, Abs = absorvância (490 nm), K = equação da curva padrão, Fator de diluição = volume aferido (10 mL) e Peso seco = massa da amostra (g).

4.3.4 Determinação de açúcares redutores totais (mg L^{-1}):

A determinação de açúcares redutores foi realizada de acordo com o método Somogyi e Nelson (BEZERRA NETO; BARRETO, 2004). Pesou-se 250 mg de amostra seca e transferiu-se para um erlenmeyer de 125 mL, acrescentando-se 20 mL de etanol (80%). Os erlenmeyers foram tampados e colocados para agitar em mesa agitadora orbital por 30 minutos. Após esta etapa os extratos foram filtrados e o volume completado para 50 mL com água destilada. Homogeneizou-se e transferiu-se uma alíquota de 10 mL para um tubo de ensaio rosqueável, sendo que os extratos diluídos foram mantidos em refrigerador até o momento da análise química.

Pipetou-se para diferentes tubos de ensaio, 200 μL dos extratos das amostras, acrescentando-se em cada tubo de ensaio 1,0 mL do reagente de Somogyi (28 g de Na_2HPO_4 , 40 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 4 g de hidróxido de sódio, 8 g de sulfato de cobre e 180 g de sulfato de sódio anidro). Os tubos foram agitados suavemente e tampados. Aqueceu-se os tubos de ensaio em banho-maria, à temperatura de 100°C por 15 minutos, após esfriou-se os tubos em banho de gelo e depois foi acrescentado 1,0 mL do reagente de Nelson [50 g de molibdato de amônio, 23 mL de ácido sulfúrico (18M) e 6 g de arsenato de sódio]. Os tubos foram agitados suavemente e ficaram em repouso por 20 minutos. Acrescentou-se 5,0 mL de água destilada e agitou-se suavemente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm. Para a elaboração da curva analítica, foi utilizado a D-glicose nas concentrações de 0 a 200 mg L^{-1} diluído em água destilada. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.5 Teor de proteínas solúveis totais – PST (mg g^{-1}):

Para a quantificação de proteína foi realizada extração de 300 mg de tecido foliar fresco macerado e homogeneizados em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} (pH 7,3) e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p / v), previamente resfriado a 4°C . Após a centrifugação por 10 min a 4°C em 7500 rpm, o

sobrenadante foi transferido para tubos de ensaios e mantido em gelo até o momento das análises. Foram colocados 100 μL do extrato proteico com 5,0 mL do reagente de Bradford (100 mg de Comassie Brilliant Blue G-250 e 100 mL de ácido fosfórico 85%) em um tubo de ensaio. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e mantidos em repouso por 5 minutos. Procedeu-se com a leitura das soluções em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando-se albumina de soro bovino (BSA 0 – 100 μg μL^{-1}) como padrão (BRADFORD, 1976). As análises foram realizadas em triplicata.

Os valores de PST foram utilizados para calcular a atividade enzimática da PAL e CHS.

4.3.6 Teor de aminoácidos solúveis totais ($\mu\text{mol g}^{-1}$):

A concentração dos aminoácidos livres totais foi determinada pelo método de Peoples et al. (1948). Pesou-se 100 mg de tecido vegetal seco, que foi acondicionado em tubo de ensaio hermeticamente fechado, contendo 5,0 mL de água destilada e incubados em banho-maria, a 100°C, por 30 min. Após, os tubos de ensaio foram centrifugados a 6.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspendido em 5,0 mL de água destilada e reextraído, como citado anteriormente. O volume final das duas etapas de extração foi corrigido para 10 mL com água destilada. A reação para dosagem dos aminoácidos livres totais foi conduzida em tubos de ensaio contendo uma alíquota de 100 μL de extrato, em presença de 1,0 mL de uma solução tamponada (pH 5,0) contendo 0,2 M de citrato; 1,0 mL do reagente de ninhidrina (KCN 0,1 mmol L^{-1} e ninhidrina 5% em methoxy etanol) e 4,0 mL de água destilada. Após homogeneização, os tubos, hermeticamente fechados, foram incubados em banho-maria, a 90°C, por 15 min. A reação foi interrompida por imersão parcial dos tubos em banho de gelo. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, a 570 nm. Utilizaram-se asparagina e glutamina como padrão. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.7 Extração de óleo essencial em folhas:

O método de extração adotado foi a hidrodestilação em aparelho Clevenger. Amostras de 100 g de folhas secas, trituradas junto à 1000 mL de água destilada em liquidificador. A mistura foi transferida para balão volumétrico de 1000

mL e o período de extração foi de 4h. Ao final do período de extração, o hidrolato obtido de cada hidrodestilação foi coletado e o óleo foi diluído com hexano. Após a diluição o óleo foi filtrado com Na₂SO₄ (sulfato de sódio anidro). O óleo filtrado foi recolhido em um vidro âmbar e depositado aberto em freezer para o hexano evaporar, obtendo-se o óleo essencial purificado.

Diante da massa 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 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 de matéria seca total de folhas por planta (g);

MSO = massa seca do óleo obtido (g).

4.3.8 Teor de polifenóis totais ($\mu\text{g mL}^{-1}$):

A concentração de polifenóis totais dos extratos foi analisada de acordo com o método de *Folin-Ciocalteu* (STAGOS et al., 2012). O procedimento foi realizado em tubos de ensaio com capacidade de 3,0 mL. Um volume de 25 μL das soluções testes foi misturado a 125 μL do reagente *Folin-Ciocalteu* e 1250 μL de água destilada. Os tubos homogeneizados ficaram em descanso por 3 min e em seguida foi adicionado 350 μL de solução de carbonato de sódio 25% (m/v) e 750 μL de água destilada. Os tubos de ensaio foram agitados e mantidos no escuro à temperatura ambiente por 1 hora. Decorrido o tempo, a absorbância foi determinada a 765 nm, utilizando espectrofotômetro.

O teor de polifenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras na curva analítica construída com padrão de ácido gálico. Para a elaboração da curva analítica, foi utilizado o ácido gálico nas concentrações de 25 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluído em álcool etílico absoluto. As concentrações de polifenóis foram expressas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.9 Teor de flavonóides totais ($\mu\text{g mL}^{-1}$):

O doseamento de flavonóides foi realizado de acordo com Yao et al. (2013). Para quantificar o teor de flavonóides totais nas folhas de *A. millefolium*, foi adicionada em tubo de ensaio uma alíquota de 100 μL do extrato junto com 400 μL de álcool 70% e 50 μL de NaNO_2 5%. Após 6 minutos foi acrescentado 50 μL da solução cloreto de alumínio (AlCl_3) 10%, 300 μL de NaOH (1 M) e 100 μL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm e o branco utilizado continha todos os reagentes exceto a amostra.

Para a elaboração da curva analítica, utilizou-se rutina diluída em álcool etílico absoluto nas concentrações de 25 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As concentrações de flavonóides foram expressas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de equivalentes de rutina. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.10 Atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase (PAL, EC 4.3.1.5):

Foi pesado 1,0 g de folhas frescas, as quais foram colocadas no almofariz, sendo acrescentado 50 mg de PVPP e aproximadamente 10 mL de nitrogênio líquido. As folhas foram maceradas com o auxílio de um pistilo e imediatamente acrescentados 3 mL da solução-tampão TRIS (0,5 M pH 8,5), contendo 1 mL de EDTA (1 mmol L^{-1}). A mistura foi homogeneizada e, em seguida, posta para centrifugar por 10 minutos, a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para microtubos e procedeu-se a avaliação da atividade enzimática (BEZERRA NETO; BARRETO, 2006).

Pipetou-se 500 μL do extrato enzimático para tubos de ensaio e acrescentando-se 2,0 mL de solução tampão TRIS-EDTA (0,5 M, pH 8,5), e 500 μL de solução de fenilalanina (30 μM), incubando-se em banho-maria a 40°C, por 1 hora. O branco foi preparado usando-se água destilada em vez da fenilalanina para cada tratamento testado. Após a incubação, os tubos foram transferidos imediatamente para banho de gelo, com o objetivo de encerrar a reação por 5 minutos. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 290 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

A atividade da enzima foi então calculada pela expressão (ZUCKER, 1965):

$$\text{kat s}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot} = \left(\frac{\Delta E}{\text{prot}(\text{mg}) \cdot t(\text{s})} \times 3 \cdot 10^{-4} \right) \times 1000$$

Onde, ΔE = variação da extinção; prot (mg) = Bradford e t(s) = tempo de reação (em segundos).

4.3.11 Atividade da enzima Chalcona sintase (CHS, EC 2.3.1.74):

A atividade da CHS foi ensaiada espectrofotometricamente como descrito por Ghasemzadeh et al. (2014). A enzima foi extraída a partir de 400 mg de folhas frescas com uma solução de 2-mercaptoetanol (1 mmol L⁻¹) dissolvido em tampão borato 0,1 M (1 mL, pH 8,8) a 4°C. Posteriormente, 0,1 g da resina Dowex 1x4 foi adicionada à solução e a mistura repousou durante 10 minutos. A solução foi então centrifugada a 15000 rpm durante 10 minutos para remover a resina. O sobrenadante foi transferido para um tubo e adicionou-se a resina Dowex 1x4 (0,2 g) e deixou-se a mistura em repouso durante 20 min. A resina foi removida da solução após centrifugação a 15000 rpm durante 15 min. O sobrenadante (100 µL) foi misturado suavemente com cianeto de potássio 10 mmol L⁻¹ e após foi adicionado o tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (1,89 mL, pH 7,8). Posteriormente, adicionou-se chalcona (10 mg) ao etileno glicol monometiléter (10 µL), misturou-se com extrato enzimático e a reação foi deixada prosseguir durante 1 min a 30°C. A absorbância foi medida a 370 nm. A curva analítica foi realizada utilizando a chalcona (2',4,4',6' ± Tetrahydroxy-chalcone) nas concentrações de 100 a 500 µg mL⁻¹ preparada a partir de naringenina (MOUSTAFA; WONG, 1967). As análises foram realizadas em triplicata.

A atividade enzimática foi calculada pela expressão:

$$\text{nkat s}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot} = \left(\frac{\Delta E \times K}{\text{prot}(\text{mg}) \cdot t(\text{s})} \right)$$

Onde, ΔE = variação da extinção; K = valor da curva padrão; prot (mg) = Bradford e t(s) = tempo de reação (em segundos).

4.4 Avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *Achillea millefolium* L.:

Por meio de diferentes testes *in vitro* foi realizada a análise da atividade antioxidante do extrato foliar de *A. millefolium*, no Laboratório de Fitoterápicos, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Assis.

Para todos os testes de atividade antioxidante, utilizaram-se extratos diluídos em concentrações de 250, 500 e 1000 µg mL⁻¹. Na apresentação dos resultados, elegeu-se a melhor concentração de extrato para cada tipo de teste (TBARS = 250 µg mL⁻¹; NO e FRAP = 1000 µg mL⁻¹). Para todos os testes as análises foram realizadas em triplicata.

4.4.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH•:

Para a avaliação da capacidade antioxidante no sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidraliza (DPPH•) foi utilizada a metodologia descrita por Blois (1958) com algumas modificações. Uma mistura reacional contendo 1 mL de tampão acetato (100 mmol L⁻¹ / pH 5,5), 1,25 mL de etanol absoluto, 250 µL de solução etanólica de DPPH• (500 µM) e 50 µL de extratos diluídos em etanol nas concentrações 250, 500 e 1000 µg / mL, foi agitada em vórtex e permaneceu em repouso por um período de 30 minutos em ambiente de pouca luminosidade. O DPPH• apresenta máxima absorvância a 518 nm, que decresce na presença de moléculas doadoras de H⁺, indicado pela mudança da coloração roxa para amarelo. As absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível a 518 nm.

A atividade sequestradora do radical DPPH• foi expressa em porcentagem sendo calculada de acordo com a seguinte equação:

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

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

Com os valores obtidos foi construído um gráfico de %AA x Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Para o cálculo da Concentração Inibitória (CI_{50}) foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH.

4.4.2 Atividade sequestradora de Óxido Nítrico (NO):

Para a avaliação da capacidade sequestradora de óxido nítrico (NO) foi utilizada a metodologia descrita por Marcocci et al. (1994) com algumas modificações. O NO foi gerado por decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio 25 mmol L^{-1} (NPS) em tampão fosfato salino (10 mmol L^{-1} / pH 7,4) (PBS) e quantificado pela reação colorimétrica de Griess, onde ocorre a formação de um cromóforo róseo durante a diazotação do nitrito com a sulfanilamida e subsequente complexação com o naftiletilenodiamino (GREEN et al., 1982). Uma mistura reacional contendo $320 \mu\text{L}$ de solução de extrato diluído em diferentes concentrações ($250, 500$ e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), $360 \mu\text{L}$ de NPS (25 mmol L^{-1} / PBS pH 7,4) e $215 \mu\text{L}$ de reagente de Griess foi adicionada em tubos de ensaio e incubada em banho-maria 37°C por 2 horas, na ausência de luz. A absorbância do teste foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm . Os resultados obtidos foram extrapolados para uma curva de calibração de nitrito de sódio, obtida sob as mesmas condições do teste e os resultados expressos em quantidade de nitrito formado ($\mu\text{M mL}^{-1}$).

4.4.3 Inibição da peroxidação lipídica (TBARS):

Para a avaliação da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica foi utilizada a metodologia de TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Species), descrita por Guimarães et al. (2010) com algumas modificações. A gema de ovo liofilizada foi homogeneizada (1%, m/v) em tampão PBS (20 mmol L^{-1} / pH 7,4). Deste homogenato, 1 mL foi sonificado e homogeneizado com $0,1 \text{ mL}$ dos extratos diluídos em diferentes concentrações ($250, 500$ e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) ou controle positivo (Trolox $140 \mu\text{g mL}^{-1}$). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de $100 \mu\text{L}$ de solução de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH; $0,12 \text{ M}$), durante 30 min em banho-maria a 37°C . Após o resfriamento em temperatura ambiente, foi adicionada a

reação 500 µL de ácido tricloroacético (15%) e 500 µL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecido em banho-maria a 97°C por 15 minutos. Após este período as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e em seguida incubadas em banho-de-gelo por mais 15 minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 532 nm e os resultados expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas por AAPH sozinho (controle induzido), sendo calculada de acordo com a seguinte equação:

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

Onde, A_{controle} é a absorbância obtida apenas com AAPH e A_{amostra} é a absorbância da amostra.

4.4.4 Atividade antioxidante pelo método FRAP:

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power) foi utilizada a metodologia descrita por Kukić et al. (2008), com algumas modificações. Esta se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+} / tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe^{2+} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, por meio da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mmol L^{-1} , pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mmol L^{-1} TPTZ em 40 mmol L^{-1} HCl) e 2,5 mL de FeCl_3 (20 mmol L^{-1}) em solução aquosa. Uma alíquota de 100 µL da solução de extrato foi adicionado a 3 mL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi obtida com sulfato ferroso (100 - 2000 µM), e os resultados expressados em $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ mg}^{-1}$ amostra.

4.5 Cromatografia

As análises de espectrometria de massas dos extratos foliares e do óleo essencial de *A. millefolium* foram realizadas no Núcleo de Bioensaios,

Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), do Departamento de Química Orgânica, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, no Instituto Química de Araraquara.

4.5.1 Fracionamento biomonitorado de extratos:

O extrato hidroalcoólico bruto da mil-folhas foi fracionado em uma coluna cromatográfica com cerca de 75% de Sílica Gel 60 (Sigma-Aldrich®) e 25% de sílica incorporada com 1,0 g do extrato hidroalcoólico.

Cerca de 250 mL de cada solvente para a eluição foi passada na seguinte sequência: Diclorometano (100%), Diclorometano : Acetato de Etila (50%:50%), Acetato de Etila (100%), Acetato de Etila : Etanol (90%:10%), Acetato de Etila : Etanol (70%:30%), Acetato de Etila : Etanol (50%:50%), Acetato de Etila : Etanol (30%:70%), Acetato de Etila : Etanol (10%:90%) e Etanol (100%) (Figura 3).

As frações filtradas foram concentradas no evaporador rotativo a $40\pm 2^\circ\text{C}$ e em seguida, realizado a cromatografia em camada delgada.

4.5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD):

Para separação e identificação dos compostos presentes nos extratos brutos (frações), foi realizado a análise por CCD, realizada pela otimização de metodologias descritas por Wagner e Bladt (1996). Foram preparadas amostras de 1000 mg mL^{-1} dos extratos brutos, a partir dos quais foram aplicadas com capilares $20\text{ }\mu\text{L}$ das amostras em cromatoplas de sílica gel em alumínio F250 ($20\text{ cm} \times 20\text{ cm}$ - MERCK), previamente ativadas em estufa a 100°C por três minutos.

a) Detecção de Flavonóides

Para fase móvel na detecção dos compostos do grupo dos flavonóides foi utilizado o sistema eluente clorofórmio-metanol-água na proporção 75:23:2 e como padrões: rutina, quercetina, ácido gálico e ácido ferúlico. A revelação das placas foi realizada por nebulização com os reveladores anisaldeído e borato de 2-aminoetoxidifenilo, sendo analisado em seguida na luz ultravioleta (254 e 366 nm). Após a definição das zonas cromatográficas, foram calculadas suas respectivas mobilidades relativas (R_f) utilizando a seguinte fórmula:

$$R_f = \left(\frac{Z_{cm}}{FRONT_{cm}} \right)$$

Onde: Z = distância até onde marcou o ponto na corrida (cm); FRONT = distância total da corrida.

4.5.3 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC/MS):

A composição química do óleo essencial foi determinada por uma amostra composta obtida pelo agrupamento de massas equivalentes do óleo essencial das repetições de cada tratamento. A análise química quantitativa foi realizada em um sistema de cromatografia gasosa acoplado a um detector de ionização em chama de hidrogênio Agilent® 7890^a equipado com coluna capilar HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) (Califórnia, EUA). Utilizou-se hélio como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL min⁻¹; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220 e 240°C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60°C com uma rampa de temperatura de 3°C min⁻¹ até 150°C, seguido por uma isoterma de 10 min e, posteriormente, de uma rampa de 10°C min⁻¹ até 270°C. O óleo foi diluído em acetato de etila (1%, v/v) e 1,0 μL foi injetado automaticamente no modo split a uma razão de 1:50. As análises qualitativas do óleo foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (G/MS), utilizando-se um equipamento Agilent® 5975C, operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan s⁻¹, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições cromatográficas foram as mesmas empregadas nas análises quantitativas. Os componentes foram identificados por comparação de seus índices de retenção com dados de espectros de massas e índices de retenção de literaturas e por comparação dos espectros de massas com os da biblioteca NIST (2008).

4.5.4 Análises dos Componentes Principais (PCA) dos compostos presentes no óleo essencial

De forma complementar, foram também realizadas análises exploratórias multivariadas, a análise de agrupamento por método hierárquico e a análise de componentes principais, que permitiram a avaliação em conjunto de todos os compostos identificados no óleo essencial. A técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma onde amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si (MOITA NETO; MOITA, 1998). Para medir a semelhança entre os centróides de cada isolado, utilizou-se a distância euclidiana (medida de dissimilaridade) para o conjunto dos compostos químicos obtidos nos óleos essenciais, enquanto para a estratégia de agrupamento adotou-se o método de Ward,s. O resultado da análise foi apresentado em forma gráfica (dendrograma), auxiliando na caracterização dos grupos.

A análise de componentes principais permite condensar a maior quantidade da informação original, contida em p variáveis. Para cada um dos tratamentos, os compostos químicos identificados e sua quantidade área em % (Tabela 12) foram plotados em planilhas de Excel. Removeram-se dessa análise aqueles compostos que apresentaram apenas traços (t) e os que não foram identificados (ni). Esses dados foram transformados em variáveis latentes ortogonais denominadas componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais criadas com os autovalores da matriz de covariância dos dados (HAIR et al., 2009). O critério de Kaiser foi utilizado para eleger os componentes principais. Um autovalor preserva informação relevante quando é superior à unidade. Também em relação a classe química dos compostos foi realizado o agrupamento k-means.

4.5.5 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS):

a) Preparo do extrato bruto:

Foram pesados 26 mg dos extratos hidroalcoólicos brutos dos tratamentos controle (T1) e 100 DAP (T3) de ambos os anos de cultivo (2016 e 2017) e diluídos em 1000 μ L de etanol (50%). Após dissolução do extrato, os mesmos passaram por um processo de *clean up*, sendo aplicada em cartucho de

SPE de 0,45 μm (Macherey-Nagel Chromabond® C18 EC). Primeiramente foram passados 5 volumes mortos de 5 mL de metanol (MeOH) grau HPLC, seguidos de 6 volumes de 5 mL de metanol HPLC : água Mili-Q (95:5) para equilíbrio do cartucho e por último foi aplicada 1 mL de amostra, e passados 4 volumes de metanol HPLC : água Mili-Q (95:5). Uma alíquota de 2 μL foi injetada no sistema de análise LC/DAD/MS para coleta dos dados cromatográficos.

b) Dissolução das amostras:

Ambas as amostras foram dissolvidas em 1,0 mL de MeOH : H₂O (50%) e diluídas para um volume final de 1,5 mL, utilizando-se MeOH : H₂O (50%) como diluente. Para a amostra Controle (T1), 35 μL foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL onde se adicionou 1.465 μL de MeOH : H₂O (50%). Já para a amostra 100 DAP (T3), 29,0 μL foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL onde se adicionou 1.471 μL de MeOH : H₂O (50%). As amostras obtidas foram centrifugadas em minicentrífuga a 10000 rpm por 3 min. Posteriormente, transferiu-se 1,0 mL de cada amostra para um vial de 2,0 mL para posterior análise. Para ambas as amostras o volume de injeção foi de 2,0 μL .

c) Preparo dos padrões:

Foram pesados os padrões: rutina (10 mg), quercetina (10,2 mg), ácido cafeico (10,2 mg), ácido trans-cinâmico (10,7 mg), ácido gálico (10,3 mg), ácido p-cumárico (10,5 mg) e diluídos em 1,0 mL de metanol grau HPLC. Para infusão direta dos padrões no LC-MS, preparou-se 1,0 mL de uma solução contendo todos os padrões à concentração de 100 ppm de cada uma das substâncias. Para a análise por LC-MS, injetou-se 2,0 μL desta solução no equipamento.

d) HPLC-DAD-MS:

A análise foi realizada utilizando um HPLC Shimadzu® Prominence: sistema modular binário, contendo: duas bombas LC-20AD, desgaseificador de fase móvel DGU-20A3R, amostrador automático SIL-20AHT, forno para colunas CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e software BrukerDaktonics, DataAnalysis, Versão 4.1. Acoplado a um espectrômetro de massas: Bruker® Amazon, com configuração ESI-IT-MS.

e) Condições para análise HPLC-DAD-MS:

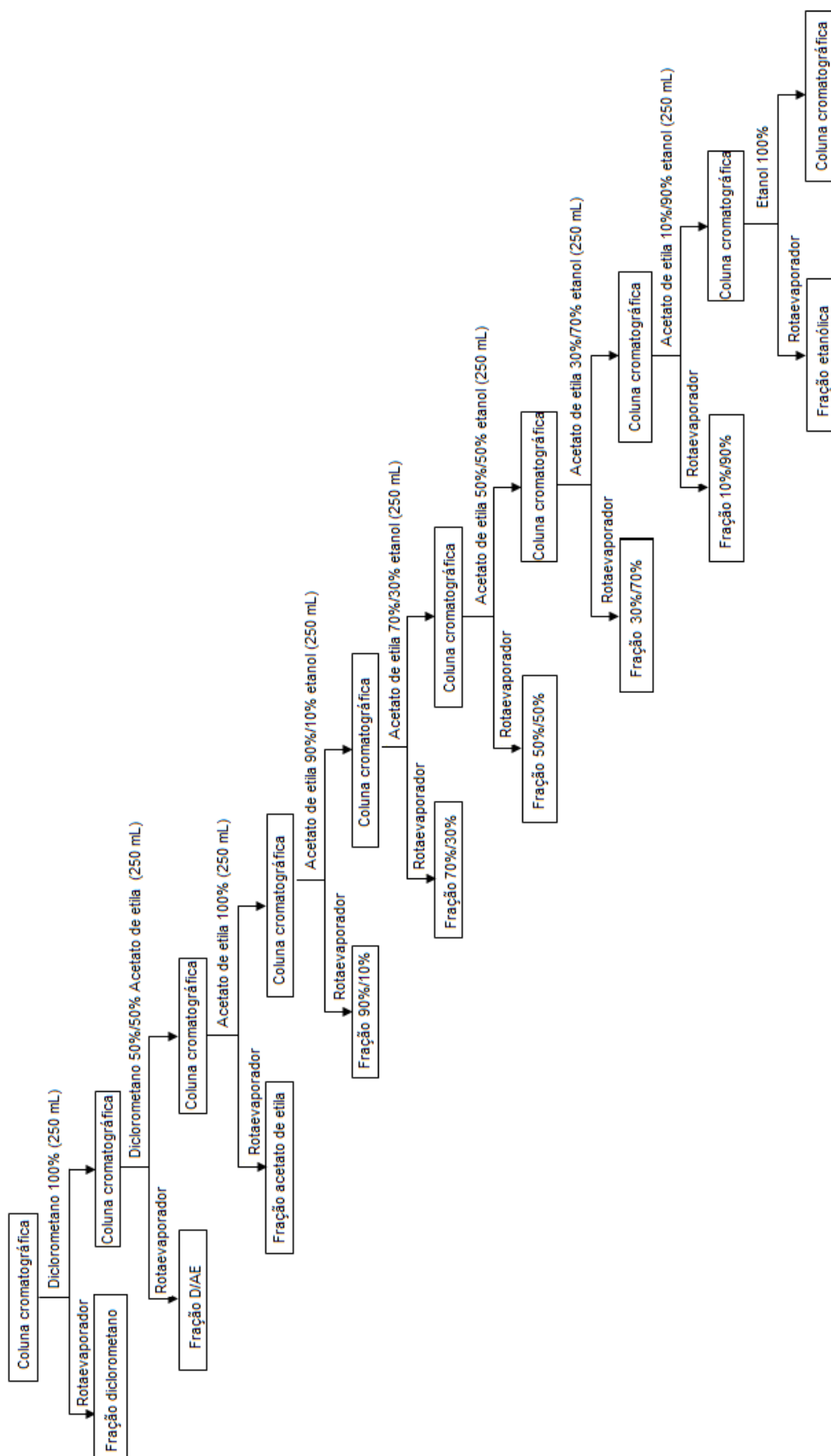
A separação por HPLC foi realizada em uma coluna Luna C18 (150 x 2,1 mm 5 μ m 100Å) (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). O gradiente exploratório foi de 5 - 100% de acetonitrila em água em 40 min, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. A cromatografia foi realizada a 40°C com fluxo de 0,5 mL / min. As amostras foram monitoradas por detector DAD na faixa de 200 - 800 nm, 40°C, frequência de amostragem em 4,1667 Hz por 50 min.

f) Condições espectrofotométricas de massa:

Os parâmetros de ionização foram os seguintes: voltagem capilar - e + 4500V, tensão da placa final -500 V; nebulização de gás de nitrogênio a 50,0 psi.; gás de secagem de 10 L / min de nitrogênio a 300 °C. A faixa de aquisição foi de 50 a 1500 m / z . Os espectros de MS² foram adquiridos no modo auto MS-MS. A amplitude de fragmentação foi ajustada em 60%, parâmetros inteligentes de fragmentação CID: amplitude inicial em 80% e final em 120%, o tempo de fragmentação foi de 20 ms, absorbância limiar de 200000 e a largura de isolamento foi de 4,0 m / z .

Foram considerados constituintes majoritários os oito constituintes que apresentaram entre os tratamentos as maiores porcentagens relativa de área dos picos.

Figura 3 - Fracionamento em uma coluna cromatográfica com 75% de Sílica Gel 60 (Sigma-Aldrich®) e 25% de sílica incorporada com 1,0 g de extrato hidroalcoólico.



4.6 Análise estatística

Os parâmetros biométricos e bioquímicos foram avaliados em esquema fatorial 3x2 (sendo três tratamentos com AS e dois anos de cultivo). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e, posteriormente ao teste Tukey ($p \leq 0,01$). Os resultados foram apresentados pela média dos tratamentos.

As atividades antioxidantes foram avaliadas comparando-se somente os tratamentos com AS. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e teste Tukey ($p \leq 0,01$). Os resultados foram apresentados pela média dos tratamentos.

As substâncias voláteis presentes no óleo essencial foram submetidas à análise multivariada utilizando-se Análise de Componentes Principais (PCA), realizadas no programa Statistica 13.3 (STATSOFT, 2017).

Realizou-se o teste de correlação de Pearson das variáveis entre os metabólitos primários e secundários e também atividades enzimáticas e antioxidante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

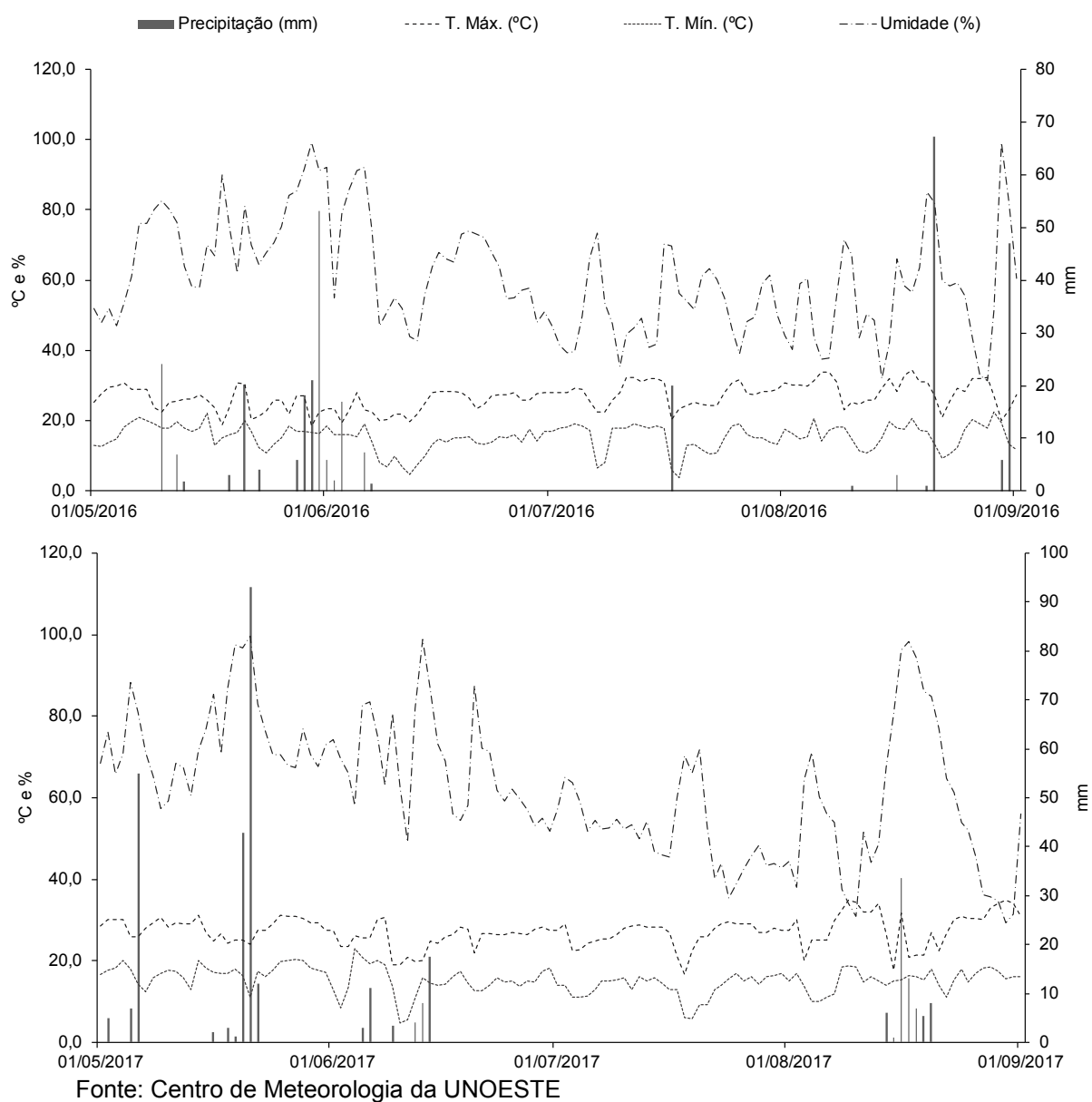
5.1 Dados climáticos

A *Achillea millefolium* L. é uma espécie de clima temperado - quente a subtropical, tolerando condições climáticas extremas como calor, geada, seca, frio e não se adapta a regiões com excesso de precipitações (LIMA et al., 2011).

As condições agrometeorológicas durante o período experimental podem ser observadas na Figura 4. No período referente ao experimento de 2016, a temperatura média foi de 21,0°C, enquanto que a média da máxima e mínima foram de 26,7 e 15,3°C, respectivamente. O total acumulado de chuva foi de 337 mm, havendo um período longo de estiagem entre os meses de junho a agosto. Na época da colheita houve precipitação de 53mm.

Em 2017, a temperatura média durante o período experimental foi de 21,1°C. As temperaturas máxima e mínima nesse período foram de 27,1 e 15,1°C, respectivamente. O total acumulado de chuva durante o período experimental foi de 341 mm, com distribuição bastante irregular, registrando-se 221 mm no mês de maio, e posteriormente, alguns picos de chuva no início de junho. Ocorreu uma longa estiagem entre a metade de junho até o fim de agosto e novamente houve estiagem no mês de setembro, num período de 13 dias antes da colheita.

Figura 4 - Dados climatológicos de Presidente Prudente, São Paulo, durante o período experimental (01 de maio à 01 de setembro de 2016 e 2017).



5.2 Parâmetros biométricos de crescimento:

5.2.1 Biomassa

Observando os parâmetros biométricos de crescimento, a análise de variância para a massa seca de folhas (MSF) foi significativa somente para o fator “época de aplicação”, sendo que nas plantas tratadas com AS nas duas épocas de

aplicação a MSF foi em média 25,3 e 21,7% maior, comparadas às plantas controle (Tabela 2).

A área foliar das plantas foi afetada de forma isolada pelos fatores época de aplicação e ano de cultivo. Houve um aumento médio de 38,7% na AF em plantas de mil-folhas tratadas aos 100 DAP em comparação às plantas controle (Tabela 2). Na comparação entre os anos de cultivo verifica-se que no plantio realizado em 2016 as plantas apresentaram maior área foliar.

Tabela 2 – Massa de matéria seca de folhas (MSF) e área foliar (AF) em plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e ano de cultivo.

Tratamentos	MSF (g planta ⁻¹)	AF (cm ²)
Controle	73,99b	6833,34b
20, 60 e 100 DAP	101,12a	9145,36b
100 DAP	103,93a**	12457,11a**
CV (%)	10,77	12,47
2016	90,73 ^{ns}	10345,37a**
2017	95,30	8611,84b

^{ns} e **: não significativo, significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Houve interação significativa entre os fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo”, havendo maiores valores de MSR e MST no ano de 2016 (Tabela 3). Em relação à MSR, foi observado um aumento em 16% em plantas tratadas aos 100 DAP (2016) e aumento de 20% quando o AS foi aplicado aos 20, 60 e 100 DAP (2017). A MST apresentou aumentos de 27% apenas em plantas com aplicação de AS aos 100 DAP (2016). No segundo ano de cultivo (2017) houve um aumento de 26,8% na MST em relação às plantas controle quando o AS foi aplicado aos 20, 60 e 100 DAP.

O número de folhas por planta (NF) apresentou interação significativa entre os fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo” (Tabela 3). Foram observados aumentos de 57,1 e 56,9% no primeiro ano de cultivo e aumentos de 21,4 e 20% no segundo ano, para plantas tratadas com AS aos 20,60 e 100 DAP e aos 100 DAP, respectivamente. Resultados diferentes foram encontrados em plantas de funcho (GORNI et al., 2017) e menta (GONÇALVES, 2017), onde as

plantas tratadas com AS não diferiram das plantas controle. Entretanto, em plantas de calêndula (PACHECO et al., 2013) e hortelã (KUNDU; HALDER; BHATTACHARJEE, 2018) a aplicação de AS resultou no aumento no número de folhas por planta.

Tabela 3 – Massa de matéria seca de raiz (MSR), massa de matéria seca total (MST) e número de folhas (NF) em plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e ano de cultivo.

Tratamentos	MSR		MST		NF	
	(g planta ⁻¹)		(g planta ⁻¹)			
	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Controle	50,61bA	54,60bA	134,88bA	134,00bA	96,40bB	127,80bA
20, 60 e 100 DAP	64,63aA	65,60aA	157,21abA	170,00aA	151,40aA	155,20aA
100 DAP	73,75aA	51,60bB	171,43aA	143,60bB	151,20aA	153,20aA
CV (%)	9,64		9,66		4,06	

Letras minúsculas comparam as épocas de aplicação “linhas” e letras maiúsculas comparam os anos de cultivo “colunas”. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O AS desempenha um papel fundamental na regulação do crescimento, no desenvolvimento das plantas e nas interações com outros organismos (HAYAT et al., 2010), sendo que a aplicação foliar de AS desencadeia maior divisão celular nas regiões meristemáticas (VANACKER et al., 2001). Plantas com maior massa de folhas podem ter apresentado maior superfície fotossintética. Já os aumentos na massa de raízes podem beneficiar as plantas pelo aumento na absorção de água e nutrientes, melhorando os processos fisiológicos como um todo. Estudos indicam que a aplicação foliar de 0,50 mmol L⁻¹ de AS resultou em aumento na biomassa de parte aérea em *Foeniculum vulgare* (GORNI et al., 2017) e melhor acúmulo de biomassa de raiz e biomassa total em *Achillea millefolium* L. cultivada em casa de vegetação (GORNI; PACHECO, 2016).

A área foliar da planta é a base de rendimento de uma cultura (PEREIRA; VILLA NOVA; SEDIYAMA, 1997), uma vez que o processo fotossintético depende da interceptação da energia luminosa e sua conversão em energia química. A área foliar é, pois, uma variável indicativa da produtividade (FAVARIN et al. 2002). Deste modo, o aumento no crescimento das plantas de mil-folhas em resposta ao tratamento com AS pode ser atribuído ao aumento da capacidade

fotossintética que favoreceu o metabolismo primário da planta. Outros estudos estabeleceram uma correlação positiva entre fotossíntese e área foliar em plantas tratadas com AS (ARFAN; ATHAR; ASHRAF, 2007; PACHECO et al., 2013). Resultados semelhantes foram obtidos em cultivares de morango, onde a aplicação de 3 mmol L⁻¹ de AS aumentou a área foliar das plantas (MOHAMEH, ABDELBASET; ABD-ELKADER, 2018) e a concentração de 200 µg mL⁻¹ de AS em hortelã (KUNDU; HALDER; BHATTACHARJEE, 2018) apresentaram aumentos na área foliar das plantas.

5.2.2 Partição de biomassa

Observando os parâmetros de partição de biomassa, a análise de variância para a área foliar específica (AFE) mostra que esta variável foi afetada pelos fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo” de maneira isolada. (Tabela 4). A aplicação de AS aos 100 DAP resultou em maior AFE, com incremento médio de 64%, apresentando melhor resultado no ano de 2016, comparando o fator “ano de cultivo”.

A razão raiz/parte aérea (RPA) de plantas tratadas com AS nas diferentes épocas de aplicação não foi alterada em relação às plantas controle em ambos os anos de cultivo (Tabela 4).

Tabela 4 – Área foliar específica (AFE) e razão raiz/parte aérea (RPA) em plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e ano de cultivo.

Tratamentos	AFE (cm ² g ⁻¹)	RPA
Controle	87,68b	0,70 ^{ns}
20, 60 e 100 DAP	91,40b	0,75
100 DAP	143,65a**	0,69
CV (%)	10,44	18,34
2016	119,59a**	0,73 ^{ns}
2017	95,57b	0,68

^{ns}, ** e *: não significativo, significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

A área foliar específica (AFE) relaciona a superfície da folha com a massa da própria folha, significando a disponibilidade de área foliar em cada grama

de folha (CRAWLY, 2001; OLIVEIRA et al., 2002). Os resultados demonstram que houve um maior investimento da folha em área fotossintética em detrimento da espessura foliar. O aumento da AFE pode estar relacionado com as alterações anatômicas que podem ocorrer nas plantas quando se utilizam elicitores ou quando ocorre estresse, sendo que as plantas investem em uma maior proporção de fotoassimilados e outros recursos no aumento da área foliar, apresentando maior AFE (BERLYN; CHO, 2000). Gonçalves (2017) verificou que a aplicação de 150 mg L⁻¹ de AS resultou em maior AFE em plantas de menta.

A razão raiz/parte aérea (RPA) é um parâmetro que permite verificar se o crescimento da raiz e da parte aérea são equilibrados para garantir um balanço funcional entre a absorção de água e a fotossíntese das plantas (GORNI; PACHECO, 2016). Desta maneira, a parte aérea continuará crescendo até que a absorção de água pelas raízes torne-se limitante, e as raízes crescerão até que a demanda por fotossintatos da parte aérea iguale-se ao suprimento. Resultados diferentes foram encontrados em plantas de milho tratadas com 20 e 40 mg L⁻¹ de AS, as quais apresentaram RPA menor do que as plantas não tratadas (AHMAD; BASRA; WAHID, 2014).

Houve interação significativa entre os fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo” para o parâmetro razão de massa foliar (RMF). No primeiro ano de cultivo da mil-folhas, as plantas tratadas com AS aos 20, 60 e 100 DAP apresentaram um aumento de 17% da RMF (Tabela 5). Já no segundo ano de cultivo, um aumento de 11,5% deu-se em plantas tratadas aos 100 DAP em comparação ao controle. Na comparação entre os anos de cultivo verifica-se que em 2017 as plantas apresentaram maior RMF independentemente dos tratamentos com AS.

Houve interação significativa entre os fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo” para o parâmetro razão de área foliar (RAF). A RAF expressa a área foliar útil para a fotossíntese, representando a razão entre a área foliar e a massa de matéria seca total (BENINCASA, 2003). Isso indica que houve maior investimento de carbono fixado para o aumento da área foliar, otimizando a captação de luz e CO₂. Houve aumentos de 22 e 56% no parâmetro RAF em plantas tratadas com AS, comparado às plantas controles no primeiro ano de cultivo (Tabela 4). Já no segundo ano de cultivo, um aumento de 94% deu-se em plantas tratadas aos 100 DAP em comparação ao controle. Comparando-se os anos de cultivo, observa-se

que o ano de 2017 apresentou o melhor resultado. Resultados diferentes foram apresentados por Gonçalves (2017), onde a RAF decresceu durante o desenvolvimento das plantas de menta tratadas com AS.

Tabela 5 – Razão de massa foliar (RMF) e razão de área foliar (RAF) em plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e ano de cultivo.

Tratamentos	RMF		RAF (cm ² g ⁻¹)	
	2016	2017	2016	2017
Controle	0,539bB	0,592bA	55,34cA	46,57bB
20, 60 e 100 DAP	0,630aA	0,612abA	67,52bA	44,75bB
100 DAP	0,581abB	0,660aA	86,30aA	90,43aA
CV (%)	5,06		9,48	

Letras minúsculas comparam as épocas de aplicação “linhas” e letras maiúsculas comparam os anos de cultivo “colunas”. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A razão de massa foliar (RMF) é definida como a fração de matéria seca produzida pela fotossíntese, não utilizada na respiração, nem exportada para outras partes da planta, ficando retida nas folhas. É dada pela relação entre MSF/MST (OLIVEIRA et al., 2002). De acordo com Farias (2012), que avaliou o crescimento e desenvolvimento do algodoeiro em função das doses de AS, a concentração de 6,02 mmol L⁻¹ de AS foi a responsável pelo maior valor de RMF, demonstrando que aplicação de concentrações superiores a essa dosagem promovem redução na RMF.

5.2.3 Teores de macronutrientes

Foram observados aumentos significativos nos teores de N (7,3 e 6%), P (12,7 e 20,1%), K (12,7 e 17,7%) e Mg (12 e 10,9%) nas folhas das plantas de mil-folhas tratadas com AS em ambas as épocas de aplicação, respectivamente (Tabela 6). Na comparação entre os anos de cultivo, verificam-se maiores teores N, P e Mg no ano de 2017, com exceção dos macronutrientes K e S, os quais não apresentaram variação significativa.

Tabela 6 – Teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg) e enxofre (S) nas folhas de *Achillea millefolium* L. tratada com ácido salicílico, em função da época de aplicação e ano de cultivo.

Tratamentos	N	P	K	Mg	S
	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)	(g kg ⁻¹)
Controle	20,57b	2,07c	24,47b	3,61b	0,68 ^{ns}
20, 60 e 100 DAP	22,19a**	2,37b	28,03a	4,10a**	0,77
100 DAP	21,88a	2,59a**	29,75a**	4,05a	0,74
CV (%)	2,88	6,69	9,80	7,01	11,10
2016	19,91b	2,02b	28,02 ^{ns}	3,65b	0,76 ^{ns}
2017	23,19a**	2,67a**	26,81	4,19a**	0,70

^{ns}, ** e *: não significativo, significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente

Houve interação significativa entre os fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo” em relação ao teor de cálcio (Tabela 7). Verificou-se que no primeiro ano de cultivo (2016) houve um aumento no teor de Ca de 27%, apenas nas plantas tratadas com AS aos 100 DAP. Já no segundo ano de cultivo (2017), houve aumento de 15,63% no teor de Ca em plantas tratadas com AS aos 20, 60 e 100 DAP, comparadas ao controle. A aplicação foliar de AS pode modular significativamente a absorção e o metabolismo de elementos minerais importantes e, por isso, melhora o crescimento e o desenvolvimento em plantas (NAZAR; UMAR; KHAN, 2015).

Tabela 7 – Teores de cálcio (Ca) nas folhas de *Achillea millefolium* L. tratada com ácido salicílico, em função da época de aplicação e o ano de cultivo.

Tratamentos	Ca	
	(g kg ⁻¹)	
	2016	2017
Controle	11,34bB	13,94bA
20, 60 e 100 DAP	12,86bB	16,12aA
100 DAP	14,40aA	14,88abA
CV (%)	6,11	

Letras minúsculas comparam as épocas de aplicação “linhas” e letras maiúsculas comparam os anos de cultivo “colunas”. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tem sido relatado que o aumento de matéria seca da planta em resposta à aplicação de AS pode ser atribuído ao aumento da absorção de nutrientes minerais (LARQUÉ-SAAVEDRA; MARTÍN-MEX, 2007), somando-se aos

efeitos de aumento da assimilação de dióxido de carbono (CO₂) e da taxa fotossintética (KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2003). Resultados encontrados por Hashmi et al. (2012) em plantas de funcho (*Foeniculum vulgare*) envasadas, mostram que a aplicação de 0,1 mmol L⁻¹ de AS, aumentou a absorção de N, P e K em 30,2, 74,6 e 8,6%, respectivamente. Da mesma forma, Sarangthem e Singh (2003) encontraram aumento no nível de N nas folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), com aplicação foliar de AS a uma concentração de 0,1%. Tucuch-Haas et al. (2017) mostraram que a concentração de 0,001 mmol L⁻¹ de AS contribuiu para o acúmulo dos elementos N, P e K em plantas de milho.

5.2.4 Fatores climáticos

As condições climáticas influenciam diretamente o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, causando alterações morfofisiológicas em plantas cultivadas (SILVA JUNIOR et al., 2012). As condições de temperatura e umidade prevalentes também desempenharam papel relevante sobre o crescimento das plantas de mil-folhas, sendo que os seus efeitos se somam aos efeitos da aplicação de AS nas plantas. No primeiro ano de cultivo (2016), observa-se que as plantas apresentaram maiores valores na massa de matéria seca (raiz e total) e na área foliar, fato esse que pode estar correlacionado à melhor distribuição da precipitação durante o período experimental. Porém, em relação aos macronutrientes nas folhas e ao número de folhas, houve maiores valores no segundo ano de cultivo (2017). Desta forma, evidencia-se que, assim como o acúmulo de biomassa, a assimilação de nutrientes também desempenha um papel relevante que se soma ao efeito da aplicação de AS nas plantas.

5.3 Parâmetros bioquímicos:

5.3.1 Metabolismo primário

5.3.1.1 Pigmentos fotossintéticos

No primeiro ano de cultivo, os teores de clorofila *a* e clorofila total em ambos os tratamentos com AS apresentaram aumentos de 14 e 2% (aplicação aos

20, 60 e 100 DAP) e 21,4 e 9% (aplicação aos 100 DAP), respectivamente, em comparação às plantas controle (Tabela 8). Entretanto, no segundo ano de cultivo (2017) verificou-se que as plantas tratadas com AS em ambas as épocas de aplicação, apresentaram aumentos de 7,4 e 22,5% (clorofila *a*) e 1 e 12,3% (clorofila total), respectivamente, comparadas às plantas controle. Aumentos nos teores de clorofila *b* foram encontrados em plantas tratadas aos 100 DAP, apresentando aumentos de 4,2% (ano de 2016) e 8,8% (ano de 2017) comparado ao controle.

Tabela 8 – Teores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total em plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e o ano de cultivo.

Tratamentos	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>		Clorofila total	
	(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Controle	3,48cA	3,14cB	8,47bB	8,88bA	11,95cB	12,02cA
20, 60 e 100 DAP	3,96bA	3,37bB	8,24cB	8,72cA	12,20bA	12,09bB
100 DAP	4,22aA	3,85aB	8,83aB	9,66aA	13,05aB	13,51aA
CV (%)	0,06		0,06		0,04	

Letras minúsculas comparam as épocas de aplicação “linhas” e letras maiúsculas comparam os anos de cultivo “colunas”. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve interação significativa entre os fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo” em relação aos teores de carotenóides e antocianinas (Tabela 9). Resultados positivos nos teores de carotenóides foram encontrados em ambas as aplicações de AS, com aumentos de 72,2 e 10,4% (ano de 2016) e 54 e 82% (ano de 2017), respectivamente, em comparação às plantas controle (Tabela 9). Em relação às antocianinas, também foram observados aumentos de 44 e 16% (ano de 2016) e 15,2 e 23% (ano de 2017) respectivamente nas plantas tratadas em comparação às plantas controle (Tabela 9). Na comparação entre os anos de cultivo, verificou-se que em 2017 houve maiores teores foliares tanto de carotenóides como de antocianinas quando a aplicação de AS foi realizada aos 100 DAP. Estes resultados corroboram com aqueles encontrados por Ghasemzadeh et al. (2014), a aplicação de 0,2 mmol L⁻¹ de AS resultou em aumento no teor de antocianinas em plantas de gengibre. Divya, Puthusseri e Neelwarne (2014) também relataram aumentos no conteúdo de carotenóides totais em plantas de coentro tratadas com 500 µmol L⁻¹ de AS.

Tabela 9 – Teores foliares de carotenóides e antocianinas em plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e o ano de cultivo.

Tratamentos	Carotenóides		Antocianinas	
	(µg mL ⁻¹)		(µg 100 g ⁻¹)	
	2016	2017	2016	2017
Controle	1,44cA	1,22cB	9,37cB	10,019cA
20, 60 e 100 DAP	2,48aA	1,88bB	13,49aA	11,540bB
100 DAP	1,59bB	2,22aA	10,83bB	12,311aA
CV (%)	0,10		1,00	

Letras minúsculas comparam as épocas de aplicação “linhas” e letras maiúsculas comparam os anos de cultivo “colunas”. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O teor de clorofila é um importante índice fisiológico diretamente relacionado com a performance fotossintética das plantas (ASKARI; EHSANZADEH, 2015). A clorofila *a* é o pigmento utilizado na primeira etapa da fotossíntese, desempenhando um papel essencial para a produção de oxigênio e bioconversão de energia pela fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013). A clorofila *b* é essencial para a fotossíntese, absorvendo luz de comprimento de onda entre 425-475 nm e transferindo sua energia para a clorofila *a* (TANAKA; TANAKA, 2007). Pesquisas com diferentes espécies vegetais indicam respostas semelhantes de aumento de pigmentos fotossintéticos em plantas pulverizadas com AS, quanto aos teores de clorofila *a* em plantas de gengibre (GHASEMZADEH; JAAFAR, 2013), clorofila *b* em plantas de girassol (DAWOOD; SADAK; HOZAYEN, 2012) e clorofila total em tomate (CHAKRABORTY et al., 2016).

Em plantas, os carotenóides desempenham um importante papel fotoprotetor, pela eliminação de EROS e supressão da peroxidação lipídica (GILL; TUTEJA, 2010). A aplicação exógena de AS exerce diversas funções fisiológicas nas plantas, como aumento dos teores de pigmentos fotossintéticos (HAYAT; ALI; AHMAD, 2007) e na síntese de carotenóides e xantofilas (MOHAREKAR et al., 2003).

As antocianinas são os pigmentos do tipo flavonóides com funções cruciais nas plantas, atuando como antioxidantes, protegendo contra à ação da luz e atuando como compostos de defesa, entre outras funções biológicas (GOLÇALVES, 2017). As antocianinas são responsáveis também pela cor das flores, frutas,

sementes e folhas (SEDAGHATHOOR; KOJEIDI; POORMASSALEGOO, 2017). Seu acúmulo é regulado por inúmeros estímulos, como mensageiros de crescimento e desenvolvimento, açúcares, hormônios vegetais e estresses ambientais (incluindo radiação ultravioleta, alta intensidade luminosa, calor, doenças, lesões, deficiências hídrica e nutricional) (GONZALI; MAZZUCATO; PERATA, 2009). Uma vez que o AS pode influenciar positivamente a fotossíntese em plantas (DIVYA; PUTHUSSERI; NEELWARNE, 2014), pode-se esperar um aumento de antocianinas, que atuam na absorção da radiação em excesso e regulam o sistema antioxidante nas células, eliminando várias espécies reativas de oxigênio formadas continuamente durante a foto-oxidação (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

5.3.1.2 Açúcares, proteínas e aminoácidos solúveis totais

A ação elicitora do AS exerce efeito indireto no aumento da concentração de metabólitos primários nas plantas tratadas, ocorrendo um reparcelamento de carbono na planta, que favorece as vias biossintéticas dos compostos secundários (BROECKLING et al., 2005), refletindo diretamente na produção de metabólicos com maior potencial antioxidante.

Verificaram-se aumentos no teor de açúcares solúveis totais (AST) de 48,5 e 17,3%, respectivamente, nas plantas de *A. millefolium* L. tratadas com AS aos 20, 60 e 100 DAP e aos 100 DAP no primeiro ano de cultivo (2016). No segundo ano de cultivo (2017), apenas as plantas tratadas aos 100 DAP apresentaram aumento de 14,2% em comparação às plantas controle (Tabela 10).

Ambas as épocas de aplicação do AS resultaram em aumentos de 72 e 64% no teor de proteínas solúveis totais (PST), respectivamente, comparadas ao controle no cultivo de 2016. Já no cultivo de 2017, houve aumento de 11,6% quando AS foi aplicado aos 100 DAP (Tabela 10).

A quantidade de açúcares redutores totais (ART) foi maior em ambas épocas de aplicação do AS, aumentando em 15,2 e 17% em comparação ao controle (ano de 2016). Já no segundo ano de cultivo, a aplicação de AS aos 100 DAP resultou em aumento de 3,6% em relação ao controle (Tabela 10).

As plantas tratadas com AS aos 100 DAP apresentaram aumento de 134% sobre o teor de aminoácidos solúveis totais (AAST) comparadas às plantas controle, no ano de 2016. No entanto, no segundo ano de cultivo, plantas tratadas

com AS em ambas as épocas apresentaram aumentos de 110,4 e 51,7% de AAST, respectivamente, quando comparadas às plantas controle (Tabela 10).

Tabela 10 - Teores de açúcares solúveis totais (AST), proteínas solúveis totais (PST), açúcares redutores totais (ART) e aminoácidos solúveis totais (AAST) em plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e o ano de cultivo.

Tratamentos	AST (mg g ⁻¹)		PST (mg g ⁻¹)	
	2016	2017	2016	2017
	Controle	25,25cA	24,50bA	1,359bB
20, 60 e 100 DAP	37,50aA	24,80abB	2,343aA	2,113bB
100 DAP	29,62bA	27,06aB	2,235aA	2,369aA
CV (%)	5,27		5,07	

Tratamentos	ART (mg L ⁻¹)		AAST (μmol g ⁻¹)	
	2016	2017	2016	2017
	Controle	20,010bA	19,908bA	15,606bA
20, 60 e 100 DAP	24,416aA	19,781bB	17,727bB	33,090aA
100 DAP	23,733aA	20,619aB	36,515aA	23,854bB
CV (%)	6,49		5,71	

Letras minúsculas comparam as épocas de aplicação “linhas” e letras maiúsculas comparam os anos de cultivo “colunas”. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estudos mostram que a pulverização de AS em folhas de plantas jovens ou até mesmo em plantas adultas resulta em alterações nos teores de carboidratos totais, tanto na parte aérea como em órgãos subterrâneos (KRASAVINA; BURMISTROVA, 2013); especialmente em relação aos açúcares solúveis - sacarose, glicose e frutose (KHAN; BANO; GURMANI, 2012; GHASEMZADEH; JAAFAR, 2012).

A regulação do conteúdo de açúcares pelo AS ocorre via mudanças nos padrões de translocação fonte - dreno e provocou um aumento significativo nos açúcares solúveis totais (AMIN; RASHAD; EL-ABAGY, 2007). Barakat (2011) relatou que a ativação da fotossíntese pode ser uma das razões para o aumento da produção de açúcar na presença de AS. Outra razão pode ser a ativação induzida por AS de enzimas que sintetizam sacarose, por exemplo, sacarose fosfato sintase e sacarose sintase (DONG; FARRÉ; THOMASHOW, 2011; GADI; LAXMI, 2012). O

fluxo de açúcares na planta pode ser um sinal de regulação metabólica (GIBSON, 2005). Além disso, os açúcares solúveis também estão envolvidos no equilíbrio de EROS e em respostas ao estresse oxidativo nas plantas (COUÉE et al., 2006). Resultados encontrados por Gashemzadeh e Jaafar (2012) mostraram que aplicação de AS em plantas de gengibre resultou em aumento no teor de açúcares solúveis totais. Também foram verificados aumentos nos teores de açúcares em plantas milho (*Zea mays* L.) tratadas com $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ de AS (FAHAD; BANO, 2012).

As plantas produzem proteínas em resposta a estresses bióticos e abióticos, sendo que algumas dessas proteínas são induzidas por fitohormônios, como o ácido salicílico (HUSSEIN; BALBAA; GABALLAH, 2007). O efeito de estimulação da AS na biossíntese de açúcares e proteínas solúveis foi associado ao aumento dos pigmentos fotossintéticos e conseqüentemente ao aparelho fotossintético (YILDIRIM; TURAN; GUVENC, 2008). Resultados semelhantes foram encontrados por Muthulakshmi e Lingakumar (2016), onde plantas de feijão-preto (*Vigna mungo*) tratadas com AS apresentaram maior teor de proteínas solúveis totais em comparação às plantas controle. Também foram verificados aumentos no teor de proteínas em plantas tratada com AS na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ comparado ao controle em plantas de hortelã (KUNDU; HALDER; BHATTACHARJEE, 2018).

Essa elevação dos teores de compostos primários e secundário da planta está relacionada ao aumento da atividade metabólica, induzida nas plantas pela ação hormonal e elicitora do AS. A elevação dos teores de açúcares redutores está relacionada à necessidade de açúcares simples, disponíveis para manter o maior metabolismo respiratório (KUHN, 2007). Estes resultados são semelhantes ao de El-Beltagi et al. (2017), onde a aplicação de AS em plantas de algodão resultou em maior teor de açúcares redutores totais.

Como um importante metabólito primário em plantas, a acumulação de aminoácidos proporciona os precursores disponíveis para a síntese de proteínas (EL-TAYEB, 2005) e metabólitos secundários para defesa contra estresse, e alguns aminoácidos, tais como prolina, servindo como osmorreguladores (RAI, 2002; BURG; FERRARIS, 2008).

Neste estudo, as análises de crescimento e do perfil metabólico primário demonstraram efeitos fisiológicos positivos da aplicação de AS em plantas

de *A. millefolium*, sugerindo que este composto pode estar associado à regulação de vários processos metabólicos primários essenciais, incluindo a fotossíntese, a respiração e o metabolismo de aminoácidos. A acumulação de solutos orgânicos no citosol (por exemplo, aminoácidos, açúcares solúveis e proteínas) e em organelas celulares ajuda no ajuste osmótico das plantas. Tais efeitos causados pela aplicação do AS são encontrados tanto na presença como na ausência de estresse (DUČAIOVÁ; PETRUŤOVÁ; REPČÁK, 2013; KAZEMI, 2014; MUTHULAKSHMI; LINGAKUMAR, 2016).

5.3.1.3 Fatores climáticos

Pode-se observar que no cultivo realizado no ano de 2016 as plantas apresentaram maiores teores dos metabólitos primários avaliados (clorofilas, açúcares, proteínas e aminoácidos). Neste primeiro ano de cultivo a precipitação total foi melhor distribuída durante o período experimental, ocorrendo um período chuvoso próximo da época de colheita. Estudos mostram que plantas de *Tithonia diversifolia* provenientes de colheita realizada durante períodos mais chuvosos também apresentaram aumentos no nível de metabólitos primários, como clorofila, proteínas e açúcares (SAMPAIO; EDRADA-ELBE; da COSTA, 2016), o que reforça a importância do ambiente sobre a resposta metabólica primária da planta. Desta forma, os maiores valores verificados em relação aos parâmetros de crescimento das plantas de mil-folhas no ano de 2016 podem ser atribuídos ao aumento da síntese metabólica primária induzida pela aplicação de AS, provavelmente como consequência da maior produção de fotoassimilados.

5.3.2 Metabolismo secundário

5.3.2.1 Teor, rendimento e composição química do óleo essencial

O teor de óleo essencial (TOE) apresentou aumento de 171% em plantas tratadas com AS aos 100 DAP no primeiro ano de cultivo (2016) e aumentos de 47 e 150% em ambas as aplicações de AS no ano de 2017 (Tabela 11). O rendimento de óleo essencial (ROE) apresentou aumento de 263,3% em plantas tratadas com AS aos 100 DAP no primeiro ano de cultivo (2016) e aumentos de

104,3 e 148% em ambas as épocas de aplicação do AS no ano de 2017, em relação ao controle (Tabela 11). Houve interação significativa entre os fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo”, sendo observado um aumento no teor e rendimento de óleo essencial das plantas tratadas com AS no ano de 2017.

Tabela 11 – Teor (TOE) e rendimento (ROE) de óleo essencial em *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação (EA) e do ano de cultivo (AC).

Tratamentos	TOE (%)		ROE (g planta ⁻¹)	
	2016	2017	2016	2017
Controle	0,17bB	0,30cA	0,12bB	0,23cA
20, 60 e 100 DAP	0,17bB	0,44bA	0,14bB	0,47bA
100 DAP	0,46aB	0,75aA	0,46aB	0,57aA
CV%	17,75		15,37	

Letras minúsculas comparam as épocas de aplicação “linhas” e letras maiúsculas comparam os anos de cultivo “colunas”. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O AS atua em plantas como um elicitor abiótico capaz de aumentar a produção de diferentes grupos de metabólitos secundários tais como terpenos, alcalóides, flavonóides, compostos fenólicos e fitoalexinas (ALI et al., 2006; SILVA et al., 2014; GHANATI et al., 2014).

Esses resultados positivos quanto ao teor e o rendimento de óleo essencial são devido ao maior crescimento vegetativo estimulado pelo AS, à maior quantidade de glândulas de óleo e ao teor de carboidratos; destacando-se também o efeito benéfico do AS sobre atividades metabólicas e enzimas responsáveis pela biossíntese de mono e sesquiterpenos (ROWSHAN; KHOI; JAVIDNIA, 2010). Resultados semelhantes de aumentos no teor e rendimento de óleo essencial em resposta à aplicação da AS foram relatados em plantas de mil-folhas (GORNI; PACHECO, 2016), funcho (HASHIMI et al., 2012; GORNI et al. 2017), manjerição e manjerona (GHARIB, 2007), hortelã (SAHARKHIZ; GOUDARZI, 2014) e sálvia (ROWSHAN; KHOI; JAVIDNIA, 2010).

Os compostos presentes no óleo essencial das folhas de *A. millefolium* são apresentados na Tabela 12. Foram identificados 29 compostos no tratamento controle, 27 compostos no tratamento T2 (aplicação de AS aos 20, 60 e 100 DAP) e

28 compostos no tratamento T3 (aplicação de AS aos 100 DAP) para o primeiro ano de cultivo (2016). No segundo ano de cultivo foram identificados 32 compostos no tratamento controle, 26 compostos no tratamento T2 e 32 compostos no tratamento T3.

Os compostos majoritários identificados nos tratamentos do primeiro ano de cultivo foram: Camazuleno, Terpinen-4-ol, Sabineno, Óxido de cariofileno, Mint oxide e γ -Terpineno (Controle); Camazuleno, Terpinen-4-ol, Cariofileno, Eucaliptol, Borneol, Óxido de cariofileno, Sabineno, Mint oxide e γ -Terpineno (T2) e Camazuleno, Cariofileno, Terpinen-4-ol, Borneol, Óxido de cariofileno, Sabineno, Eucaliptol, Mint oxide e γ -Terpineno (T3). No segundo ano de cultivo os compostos majoritários foram: Germacreno D, Camazuleno, α -Farneseno, Cariofileno e Eucaliptol (Controle); Germacreno D, Camazuleno, α -Farneseno, Sabineno e Cariofileno (T2) e Germacreno D, Camazuleno, Sabineno, α -Farneseno, Cariofileno e Eucaliptol (T3).

O Camazuleno (29,03% - 35,45%) foi o principal composto presente em todos os tratamentos no primeiro ano de cultivo (2016), apresentando um aumento na porcentagem deste composto quando as plantas foram tratadas com AS aos 100 DAP. O γ -Terpineno (3,30% - 3,60%) e Terpinen-4-ol (6,72% - 7,89%) aumentaram quando o AS foi aplicado aos 20, 60 e 100 DAP. O Germacreno D (0,27%), apresentou pico, apenas no tratamento 100 DAP. Entretanto, o Cariofileno, Eucaliptol, Sabineno e o Borneol foram afetados negativamente pela aplicação de AS, ocorrendo uma diminuição na porcentagem destes componentes. Já no segundo ano de cultivo (2017), os constituintes mais expressivos foram: Camazuleno (6,25% - 10,54%), Cariofileno (3,37% - 3,55%) e o Borneol (1,56% - 1,70%), apresentando aumentos quando o AS aplicado aos 100 DAP. Porém, os compostos Germacreno D, Sabineno, Eucaliptol, Terpinen-4-ol e γ -Terpineno, diminuíram com a aplicação do AS. Os picos relacionados ao índice de retenção dos componentes do óleo essencial majoritários, estão identificados na Figura 6.

Os componentes do óleo essencial identificados neste estudo foram muito semelhantes aos relatados por Rowshan e Bahmanzadegan (2013), Tadić et al. (2017) e Mohammadhosseini, Sarker e Akbarzadeh (2017) para *A. millefolium*. Estudos mostram que a espécie *A. millefolium* aumenta continuamente o componente α -pineno do estágio vegetativo até o brotamento, enquanto os níveis de β -pineno, 1,8-cineol, borneol e β -cariofileno diminuem nas fases iniciais até o início

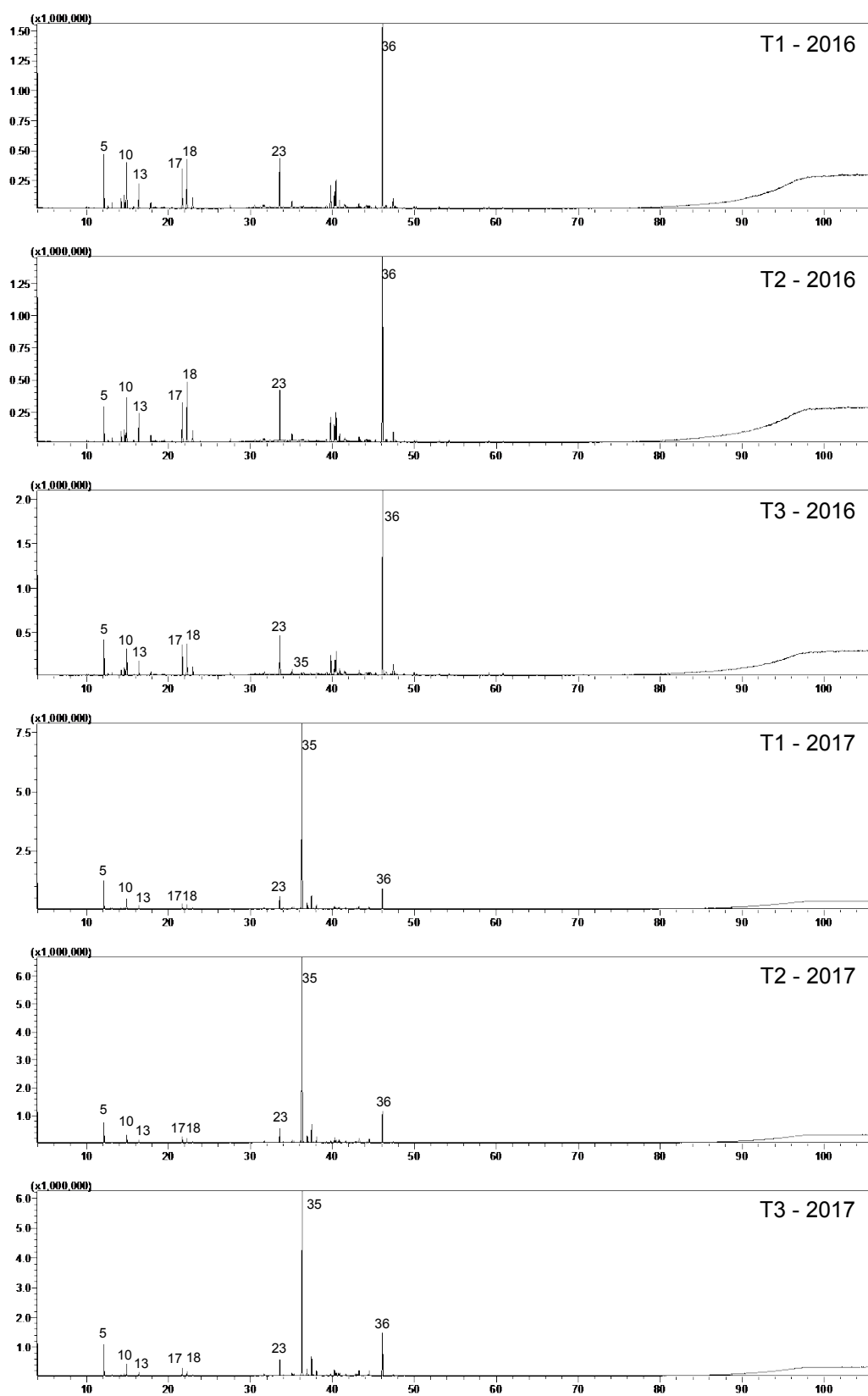
do florescimento, após esta fase os componentes voltam a aumentar (ROWSHAN; BAHMANZADEGAN, 2013). O camazuleno é o constituinte responsável pela coloração azul do óleo essencial de *A. millefolium* (NADIM et al., 2011; EDREVA et al., 2017) e foi o que apresentou maior porcentagem entre os constituintes identificados (Tabela 12). A maioria destes compostos apresentam um interesse especial por causa de suas amplas aplicações industriais e devido aos seus efeitos na saúde animal e humana (SILVA et al. 2010). Entretanto, resultados encontrados por Rowshan e Bahmanzadegan (2013), mostram que as concentrações de 200 e 400 mg L⁻¹ de AS apresentaram reduções nos compostos identificados do óleo essencial de *A. millefolium*, apresentando aumentos apenas para o Borneol. Sarrou et al. (2016), relataram que a aplicação dos elicitores: melatonina, ácido giberélico e AS, apresentaram aumentos na concentração de óleo essencial em laranja, apresentando aumentos nos constituintes Limonene e Linalool.

Tabela 12 – Cromatografia (GC/MS) do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.

Picos nº	Componentes	IR	Área %					
			Controle		20, 60 e 100 DAP		100 DAP	
			2016	2017	2016	2017	2016	2017
Hidrocarbonetos Monoterpenos								
1	α -Pineno	897	0,14	0,32	-	0,21	0,12	0,20
2	Canfeno	902	0,18	0,19	-	-	0,15	0,17
3	Sabineno	943	6,02	6,17	3,94	3,63	4,84	5,76
4	β -Pineno	948	0,34	0,05	0,27	0,22	0,30	-
5	β -Mirceno	964	0,64	0,44	0,54	0,24	0,45	0,40
6	(+)-4-Careno	969	1,20	0,41	1,31	-	0,82	0,32
7	p -Cimeno	998	1,65	-	1,50	-	1,18	-
8	γ -Terpineno	1023	3,30	0,91	3,60	0,69	2,27	0,80
9	o -Cimeno	1042	-	0,46	-	0,29	-	0,46
10	Isoterpinoleno	1042	0,91	0,15	0,80	-	-	0,15
Monoterpenos Oxigenados								
11	α -Thujeno	873	0,26	0,25	-	0,17	0,17	0,17
12	Eucaliptol	969	6,60	2,79	6,05	1,84	4,60	2,66
13	p -menth-2-en-1-ol	1059	0,36	-	0,34	-	0,19	-
14	Borneol	1137	5,24	1,56	5,08	1,44	5,09	1,70
15	Terpinen-4-ol	1138	6,72	1,60	7,89	1,02	5,14	1,11
16	L- α -Terpineol	1138	1,63	0,41	1,70	0,33	1,41	0,40
Hidrocarbonetos Sesquiterpenos								
17	β -Copaeno	1216	-	0,36	-	0,34	-	0,31
18	α -Copaeno	1266	0,32	0,45	0,31	0,48	0,32	0,55
19	Cariofileno	1277	6,93	3,37	6,92	3,16	6,73	3,55
20	Humuleno	1281	0,91	0,55	0,92	0,55	0,80	0,58
21	Óxido de cariofileno	1435	4,77	0,56	4,77	1,01	5,02	1,06
22	γ -Murolene	1435	-	0,44	-	0,53	-	0,47
23	(E)- β -Farneseno	1440	-	0,51	-	0,38	-	0,45
24	α -Murolene	1440	-	0,40	-	0,40	-	0,38
25	α -Farneseno	1458	-	3,53	-	4,03	-	4,15
26	Germacreno D	1515	-	54,25	-	45,93	0,27	43,54
Sesquiterpenos Oxigenados								
27	Espatuleno	1431	0,80	-	0,77	1,47	0,87	1,55
28	Salvial-4(14)-en-1-one	1435	1,08	0,69	1,10	0,87	1,17	0,86
29	ento-Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 β -ol	1437	0,36	1,24	0,53	1,74	0,69	2,04
30	Aromadendrene oxide-(2)	1462	-	-	0,34	-	-	0,56
31	Ylangenal	1536	0,49	-	0,46	-	0,58	0,22
Outros								
32	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	938	-	0,40	-	-	-	0,29
33	1-Octeno-3-ol	958	0,32	0,14	0,31	-	0,21	-
34	1-Nonen-3-ol	1013	0,27	0,07	0,25	-	-	-
35	Acetato de Bornyl	1143	0,47	0,10	0,45	-	0,35	-
36	Mint oxide	1386	3,47	0,25	3,66	0,80	3,53	0,70
37	Camazuleno	1530	29,03	6,25	28,11	8,08	35,45	10,54
38	Fitol	2045	0,39	-	0,30	-	0,60	0,28
Identificação total (%)			84,80	89,27	82,22	79,85	83,32	86,38
Grupos de compostos (%)								
Hidrocarbonetos Monoterpenos			14,38	9,10	11,96	5,28	10,13	8,26
Monoterpenos Oxigenados			20,81	6,61	21,06	4,80	16,60	6,04
Hidrocarbonetos Sesquiterpenos			12,93	64,42	12,92	56,81	13,14	55,04
Sesquiterpenos Oxigenados			2,73	1,93	3,20	4,08	3,31	5,23
Outros			33,95	7,21	33,08	8,88	40,14	11,81

IR – índice de retenção.

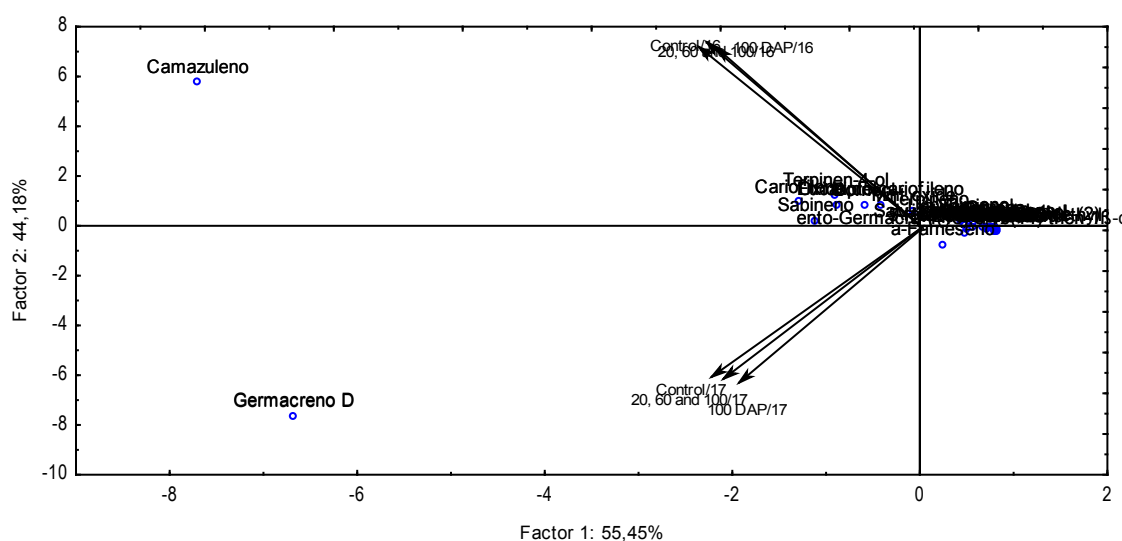
Figura 5 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico.



5.3.2.2 Análise dos componentes principais (PCA)

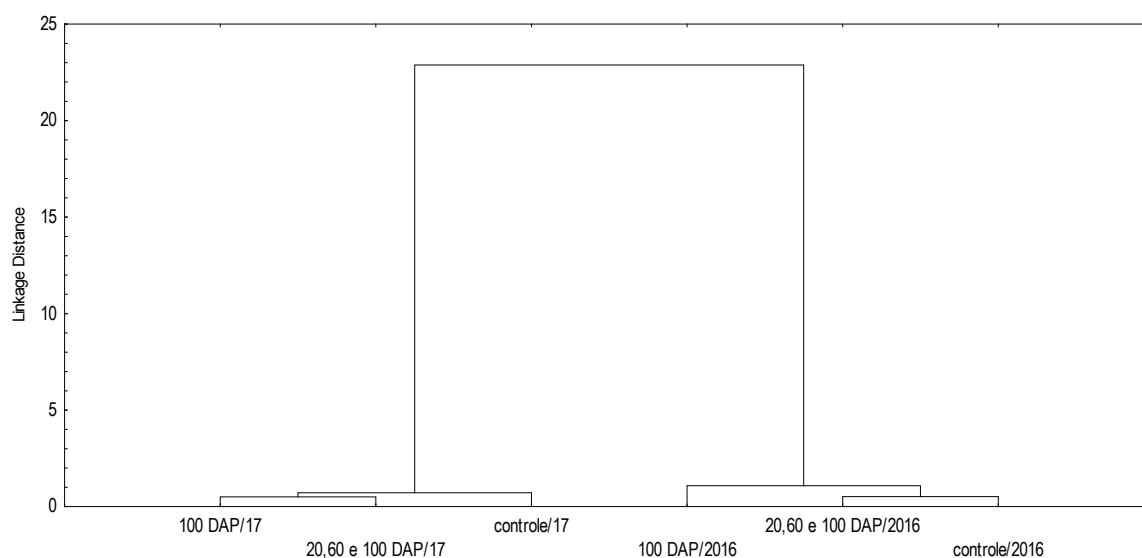
Na Figura 6, podem ser observados os resultados da análise dos componentes principais (PCA) do perfil químico de substâncias voláteis de plantas de *A. millefolium* tratadas com AS nos dois anos de cultivo. Os componentes do óleo essencial de mil-folhas são representados por dois eixos, os quais apresentam 99,63% da variância total acumulada (Fator 1: 55,45%; Fator 2: 44,18%). Observa-se que os componentes Camazuleno e Germacreno D apresentam um padrão de resposta ao AS diferente de todos os demais componentes do óleo essencial. De fato, esses são os componentes que apresentam maior área (%) de acordo com a Tabela 12. Porém, estes dois componentes não se agrupam, ou seja, não respondem de forma similar à elicitação com AS. O Camazuleno foi o componente predominante e presente em todos os tratamentos, apresentando aumentos de 22,11% no tratamento 100 DAP para o ano de 2016 e 29,28 e 68,64% em ambos os tratamentos com AS para o ano de 2017. Tais aumentos representaram 44,18% da variância observada nos componentes do óleo essencial. Já a quantidade de Germacreno D apresentou queda de 18,12 e 24,6% nas plantas tratadas com AS (T2 e T3 respectivamente), no segundo ano de cultivo, respondendo por 55,45% da variância observada na qualidade do óleo em resposta ao AS.

Figura 6 - Componentes principais obtidos por meio da composição química do óleo essencial de plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.



A análise hierárquica foi aplicada para entender a variabilidade química do óleo essencial de plantas de *A. millefolium* tratadas com AS. Obteve-se um dendrograma (Ward,s) que agrupou os dados em quatro grupos principais classificados pelos tratamentos com AS. O primeiro cluster é formado pelo Controle e o tratamento T2 (AS aplicado aos 20, 60 e 100 DAP), para o ano de 2016. O segundo cluster incluiu apenas o tratamento T3 (AS aplicado aos 100 DAP). O terceiro cluster foi formado apenas pelo Controle e o quarto cluster incluiu os tratamentos T2 e T3, para o ano de 2017 (Figura 7).

Figura 7 - Dendrograma (Ward,s) obtidos por meio da composição química do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.



Nas Figuras 8 e 9, podem ser observados os resultados das classes químicas do óleo essencial de plantas de *A. millefolium* tratadas com AS nos dois anos de cultivo. Os componentes do óleo essencial de mil-folhas são representados por dois eixos, os quais apresentam 99,07% da variância total acumulada. Tais aumentos representaram 54,31% da variância observada nos componentes do óleo essencial para os grupos: Outros (ano de 2016) e Hidrocarbonetos Sesquiterpenos (ano de 2017) e o 44,76% da variância observado foi devida para os demais grupos químicos identificados. O grupo de Sesquiterpenos Oxigenados apresentou resposta diferente em relação aos demais grupos, o que está em concordância com os menores valores de área (%) observados na Tabela 12.

Figura 8 - Componentes principais obtidos por meio das classes químicas do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.

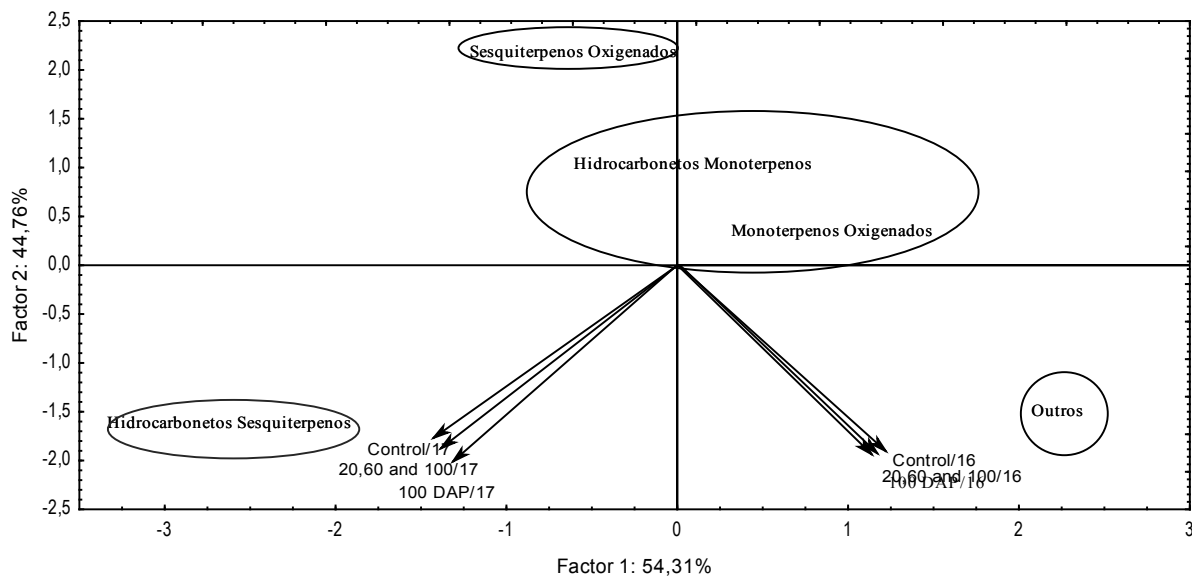
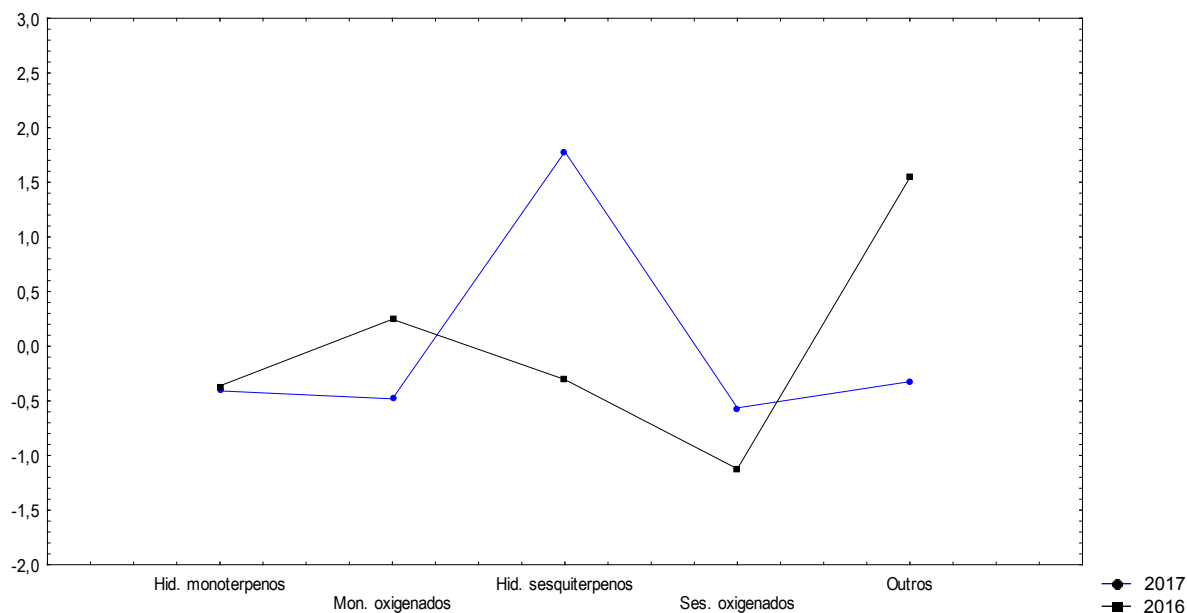


Figura 9 - K-means obtidos por meio das classes químicas do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.



5.3.2.3 Teores de polifenóis totais, flavonóides totais e cromatografia do extrato hidroalcoólico

Houve interação significativa entre os fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo” em relação aos teores de polifenóis e flavonóides totais das plantas de *A. millefolium* tratadas com AS (Tabela 13).

A aplicação exógena de AS em ambas as épocas de aplicação resultou em aumentos na acumulação de polifenóis totais. Plantas tratadas com AS apresentaram aumentos nos polifenóis totais presentes nas folhas em 8 e 2% (ano de 2016) e 18,5 e 55,5% (ano de 2017) para os tratamentos T2 e T3 respectivamente, em relação às plantas controle (T1) (Tabela 13).

Os teores de flavonóides totais em folhas de *A. millefolium* foram 66 e 108% maiores em ambas as aplicações de AS em relação às plantas controle no primeiro ano de cultivo. Já no segundo ano de cultivo, plantas tratadas com AS apresentaram aumentos de 69,2% nos teores de flavonóides quando AS foi aplicado aos 100 DAP, comparado ao controle (Tabela 13). Na comparação entre os anos de cultivo, observou-se que os teores de polifenóis e flavonóides totais foram maiores no ano de 2016.

Estes resultados corroboram com aqueles encontrados por Sarrou et al. (2015), onde plantas de laranja-azedada tratadas com 1,0 mmol L⁻¹ de AS apresentaram aumentos de 46,5% nos teores de compostos fenólicos em comparação ao controle. Pérez et al. (2014) relatam que plantas de hortelã tratadas com AS, apresentaram um aumento no teor de polifenóis total de 65%, 35% e 31% para as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mmol L⁻¹, respectivamente. Bagherifard et al. (2015) relataram que plantas de alcachofra tratadas com AS, apresentaram aumentos significativos nos teores de flavonóides. Pacheco et al. (2013) observaram aumentos no teor de flavonóides totais em plantas de calêndula em resposta à aplicação de 1,0 mmol L⁻¹ de AS.

Tabela 13 – Teores de polifenóis totais e flavonóides totais do extrato hidroalcoólico de plantas *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e do ano de cultivo.

Tratamentos	Polifenóis totais		Flavonóides totais	
	(µg mL ⁻¹)		(µg mL ⁻¹)	
	2016	2017	2016	2017
Controle	144,29cA	79,28cB	131,45cA	130,80bA
20, 60 e 100 DAP	155,12aA	93,92bB	218,21bA	151,70bB
100 DAP	146,94bA	123,26aB	272,87aA	221,28aB
CV (%)	1,09		7,74	

Letras minúsculas comparam as épocas de aplicação “linhas” e letras maiúsculas comparam os anos de cultivo “colunas”. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A mais importante função biológica dos compostos fenólicos com significado estrutural é a atividade antioxidante. Os antioxidantes são substâncias químicas presentes em concentrações baixas, em comparação aos metabólitos primários, tais como proteínas, lipídios e hidratos de carbono; capazes de retardar ou evitar a oxidação dos substratos (SOUSA et al., 2007). Compostos fenólicos ou polifenóis podem atuar como antioxidantes por remoção do oxigênio singlete e outros radicais livres nas células (SHAHIDI; AMBIGAIPALAM, 2015). As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos são devidas principalmente à sua capacidade de doar hidrogênio de grupos hidroxila posicionados ao longo do anel aromático, de modo a evitar a oxidação de lipídios e outras biomoléculas por radicais livres (FOTI et al., 1994). Os compostos fenólicos exercem diferentes funções fisiológicas relacionadas à sobrevivência dos vegetais e têm uma importância fundamental na adaptação das plantas às alterações ambientais impostas (VERMA; SHUKLA, 2015).

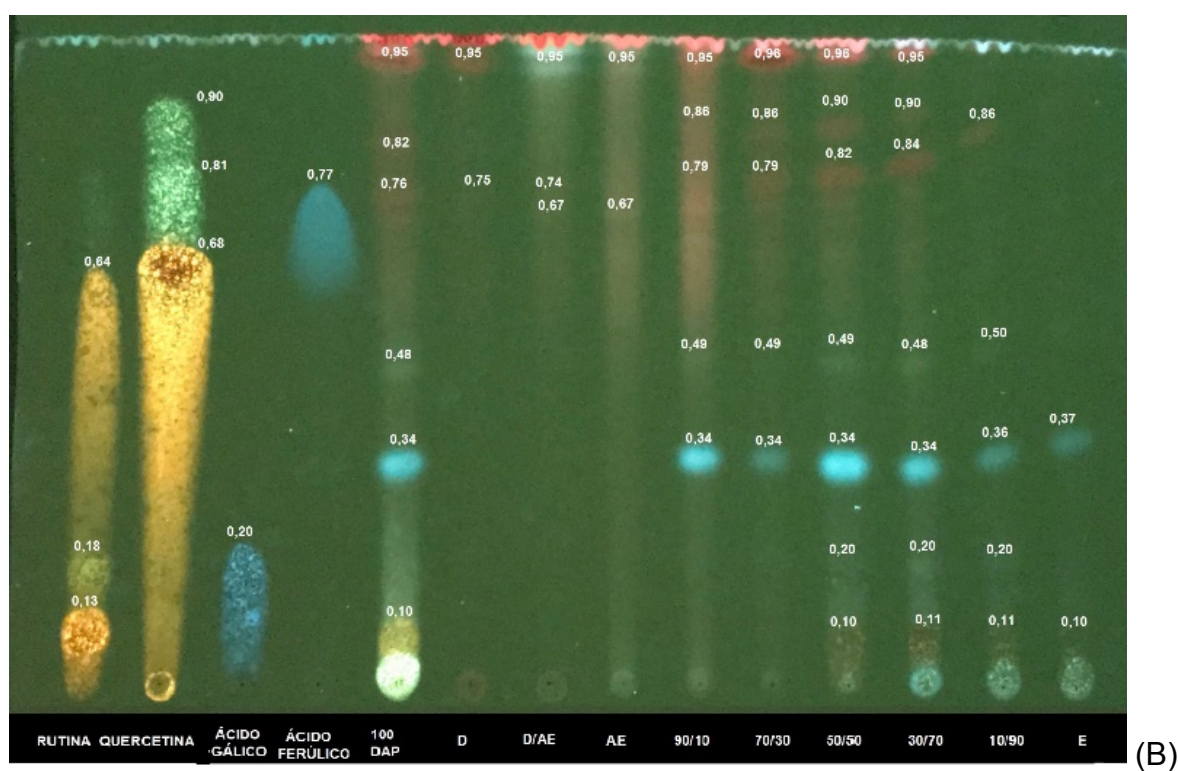
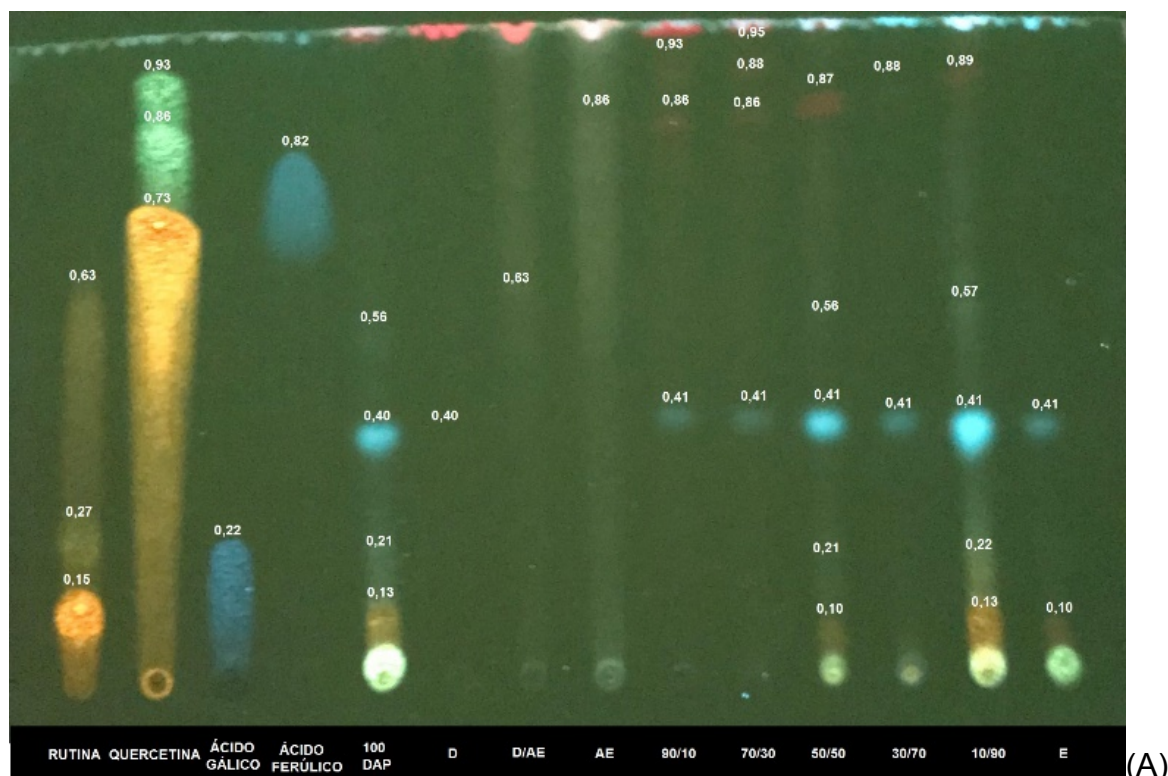
Plantas de *Achillea millefolium* L. apresentam boa capacidade de eliminação de radicais livres e, portanto, podem ser utilizadas como um inibidor natural de radicais livres, possivelmente atuando como um antioxidante primário (GEORGIEVA et al., 2015). Desta maneira, pelos resultados deste estudo é possível afirmar que a aplicação foliar de AS nesta espécie medicinal potencializa a sua atividade antioxidante. Esse efeito pode ser atribuído ao aumento de compostos fenólicos nas plantas tratadas com AS, desde que existe uma correlação positiva entre teor de compostos fenólicos e aumento da atividade antioxidante (DONG;

WAN; LIANG, 2010; PÉREZ et al., 2014; RODRIGUES-BRANDÃO et al., 2014). Os fenóis são considerados os principais compostos antioxidantes na planta. Entretanto, outros compostos também podem atuar como sequestradores de radicais livres, contribuindo para a estabilização do estresse oxidativo, tais como açúcares (como mostram os resultados da Tabela 10), betacianinas (RODRIGUES-BRANDÃO et al., 2014) e terpenos como carotenoides e tocoferol (JANDA et al., 2014).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma das técnicas mais utilizadas para a separação e identificação de compostos presentes em extratos vegetais, afim de caracterizar os compostos constituintes via comparação com os padrões analisados (VALENTE et al., 2006). O fracionamento de um extrato vegetal é realizado a fim de extrair seletivamente os compostos de igual polaridade por meio da partição por solventes orgânicos de polaridade crescente ou partição ácido-base (através de um solvente que reaja quimicamente com o composto) (SIMÕES et al., 2007). A eluição cromatográfica e os cálculos dos referidos valores de Rf indicaram a presença de compostos polifenólicos nas diferentes frações, nas plantas cultivadas em 2016 (Figura 6A), onde alguns destes valores foram semelhantes aos encontrado para os padrões rutina (0,63, 0,27 e 0,15), quercetina (0,93, 0,86 e 0,73), ácido gálico (0,22) e ácido ferúlico (0,82). No cultivo de 2017 (Figura 6B) alguns dos valores de Rf também foram semelhantes aos encontrados para os padrões rutina (0,64, 0,18 e 0,13), quercetina (0,90, 0,81 e 0,68), ácido gálico (0,20) e ácido ferúlico (0,77).

Estudos mostram que os grupos mais importantes de princípios farmacologicamente ativos presentes em *A. millefolium* são os flavonóides luteolina, apigenina, luteolina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-glucósido e rutina, entre outros; como também ácidos fenolcarbônicos (por exemplo, ácido clorogênico) (APPLEQUIST; MOERMAN, 2011; VILLANUEVA BERMEJO et al. 2017). O ácido gálico, derivado do ácido hidroxibenzóico, possui atividade antioxidante relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e com a proximidade do grupo $-CO_2H$ em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (MAMEDE; PASTORE, 2004).

Figura 10 - Cromatograma do fracionamento do extrato hidroalcoólico (T3) de *A. millefolium* L. cultivadas em 2016 (A) e 2017 (B). Padrões: rutina, quercetina, Ácido Gálico e Ácido Ferúlico, em sistema eluente Clorofórmio-metanol-água (75:23:2). Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).



Os flavonóides estão entre os metabólitos secundários mais bioativos nas plantas com propriedades fotoprotetoras (MARKHAN et al., 1998), sendo a luteolina e a apigenina os flavonóides majoritários encontrados nas flores e folhas de mil-folhas (ALI; GOPALAKRISHNAN; VENKATESALU, 2017).

Foi realizado o LC/MS dos extratos brutos de *A. millefolium* comparando-se as plantas controle (T1) com aquelas que receberam a aplicação do AS aos 100 DAP (T3) (pois neste tratamento houve maior atividade antioxidante do extrato vegetal, em ambos os anos). Os compostos fenólicos com possíveis atribuições são apresentados na Tabela 14. Foram identificados 21 compostos ao todo em ambos os tratamentos. Houve aumento na porcentagem de 17 compostos no primeiro ano de cultivo (2016) e 8 compostos no segundo ano de cultivo (2017) para o tratamento T3 (aplicação de AS aos 100 DAP), comparado aos compostos identificados no tratamento T1 (controle).

Os compostos majoritários encontrados foram: ácido quínico, ácido 4-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-cafeoilquínico, rutina, ácido 3,4-O-dicafeniolquínico, ácido *cis*-3,5-O-dicafeniolquínico e ácido 4,5-O-dicafeniolquínico. Entretanto, a aplicação de AS aumentou todos os compostos majoritários no primeiro ano de cultivo (2016), já no segundo ano de cultivo (2017), houve aumentos apenas dos compostos: ácido quínico, rutina e ácido 4,5-O-dicafeniolquínico. Os picos relacionados ao índice de retenção dos compostos fenólicos, estão identificados na Figura 7.

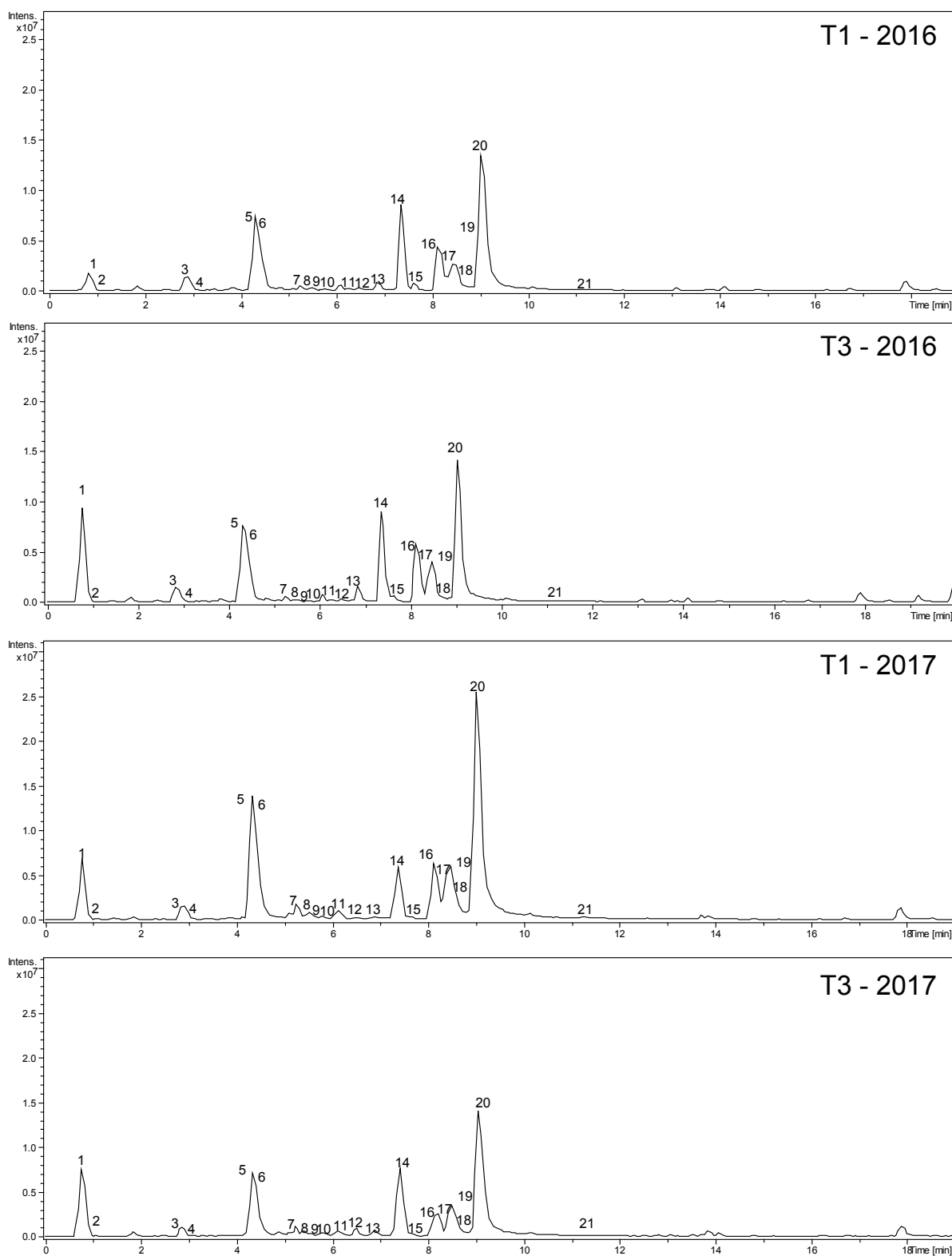
Embora os compostos majoritários sejam os mesmos nas plantas controle e nas plantas tratadas com AS, a ocorrência de uma maior atividade antioxidante (verificada com base em diferentes testes) nas plantas elicitadas, revelam que a aplicação de AS resultou em maiores porcentagens dos compostos bioativos no primeiro ano de cultivo. Podendo, desta forma, correlacionar essas maiores concentrações de compostos bioativos identificados aos maiores teores de polifenóis e flavonóides (Tabela 12) e a atividade antioxidante (Tabela 17).

Tabela 14 – Análise de compostos fenólicos e flavonóides por LC/MS em plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico.

Pico	T _r (min)	Íon Molecular [M-H] ⁻ (m/z)	Possíveis atribuições	MS ² (m/z)	Área (%)			
					2016		2017	
					T1	T3	T1	T3
1	0,8	191	Ácido quinico	173, 127, 111, 93, 85	9,95	52,33	21,09	34,64
2	0,8	341	Ácido cafeico	179	1,81	4,38	0,59	1,40
3	2,9	353	Ácido 3-O-cafeoilquinico	191, 179, 173, 135	9,70	10,40	6,48	4,38
4	2,9	447	Luteolina 6-C-glucosídeo	357, 327, 297, 285	3,63	3,21	2,89	3,18
5	4,1	353	Ácido 4-O-cafeoilquinico	191, 179, 173, 135	53,37	64,03	58,26	40,77
6	4,4	353	Ácido 5-O-cafeoilquinico	191, 179, 173, 135	53,40	64,07	58,55	40,66
7	5,1	353	Ácido 6-O-cafeoilquinico	191, 179, 173, 135	1,77	1,93	2,57	1,93
8	5,1	353	Ácido clorogênico	191	1,69	1,81	3,37	1,37
9	5,5	431	Apigenina 7-O-glucosídeo	269	0,73	1,22	2,07	1,44
10	5,5	337	Ácido p-coumaroil-quinico	191	1,67	1,37	1,39	1,64
11	6,1	367	Ácido feruloil-quinico	193, 191, 173	2,43	3,13	4,19	3,35
12	6,4	431	Apigenina 8-O-glucosídeo	269	0,73	1,65	0,66	0,81
13	6,9	595	Quercetina O-pentossil-hexosídeo	301	4,56	8,14	1,56	3,03
14	7,4	609	Rutina	301	43,02	52,28	21,63	38,91
15	7,6	463	Quercetina O-hexosídeo	301	3,59	3,59	1,36	1,33
16	8,1	515	Ácido 3,4-O-dicafeoilquinico	353, 335, 299, 255, 203, 191, 179, 173, 161, 135	24,80	41,94	20,08	13,94
17	8,3	593	Luteolina 7-O-rutinose	285, 253, 179, 151	1,91	3,84	5,25	3,22
18	8,5	537	Amentoflavona	375	2,08	2,28	3,89	1,05
19	8,5	515	Ácido cis 3,5-O-dicafeoilquinico	353, 335, 191, 179, 173, 161, 135	21,45	30,02	28,24	22,32
20	9,0	515	Ácido 4,5-O-dicafeoilquinico	353, 335, 299, 255, 203, 191, 179, 173, 161, 135	82,34	76,91	77,98	89,31
21	11,2	579	Kaempferol O-pentossil-hexosídeo	417, 285	0,59	0,67	1,24	0,76

T_r – Tempo de retenção; MS² - fragmentação.

Figura 11 – Cromatografia (LC/MS) característico dos extratos de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico.



5.3.2.4 Atividade enzimática

Estudos relatam que plantas tratadas com AS apresentam respostas de defesa estimuladas, incluindo a acumulação de produtos da rota dos fenilpropanóides (RIVAS-SAN VICENTE; PLASENCIA, 2011), na qual as duas enzimas chave são a fenilalanina amônia-liase (PAL) e chalcona sintase (CHS).

Houve efeito significativo isolado dos fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo” com relação à atividade da enzima PAL (Tabela 15) As plantas de mil-folhas tratadas com AS em ambas as épocas de aplicação apresentaram aumentos de 29,3 e 31,9% na atividade da PAL, respectivamente, comparada com a atividade enzimática das plantas controle.

Tabela 15 - Atividade enzimática da fenilalanina amônia-liase (PAL) em plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e ano de cultivo.

Tratamentos	PAL (kat s ⁻¹ mg ⁻¹ prot)
Controle	10,49b
20, 60 e 100 DAP	13,00a
100 DAP	13,67a**
CV (%)	8,42
2016	13,04a**
2017	11,72b

Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Já em relação à atividade da enzima CHS, houve interação significativa entre os fatores “época de aplicação” e “ano de cultivo” (Tabela 16). A atividade da CHS também foi maior em plantas tratadas com AS em ambos os anos de cultivo, resultando em aumentos de 17 e 42,2% para as duas épocas de aplicação do AS (ano de 2016) e 24,8 e 31,2% (ano de 2017), respectivamente, comparadas com as plantas controle. Na comparação entre os anos de cultivo, observou-se um aumento na atividade da CHS no ano de 2016.

Tabela 16 - Atividade enzimática da chalcona sintase (CHS) em plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e ano de cultivo.

Tratamentos	CHS	
	(nkat s ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	
	2016	2017
Controle	131,83cA	109,50cB
20, 60 e 100 DAP	154,38bA	136,70bB
100 DAP	187,41aA	143,68aB
CV (%)	1,62	

Letras minúsculas comparam as épocas de aplicação “linhas” e letras maiúsculas comparam os anos de cultivo “colunas”. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estes resultados demonstram que como um elicitor, o AS regula a atividade da enzima PAL, a qual catalisa reações biossintéticas para formar compostos defensivos (IBRAHIM et al., 2011). O aumento da atividade da PAL sugere incrementos nos teores de compostos fenólicos (Tabela 13), já que esta é uma enzima chave para a principal rota de síntese dos mesmos, denominada rota do ácido chiquímico (MAZARO et al., 2015). O presente estudo mostrou que a aplicação de AS também aumentou a atividade da CHS, devido ao aumento da atividade da PAL, visto que estas duas enzimas atuam em sequência. A chalcona sintase é considerada uma enzima chave por ser a primeira enzima a direcionar o metabolismo de fenilpropanóides em direção à síntese de flavonóides (SAITO et al., 2013). Portanto, os aumentos na produção de antocianinas (Tabela 9) e flavonóides totais (Tabela 13) no presente trabalho podem ser atribuídos ao aumento da atividade da enzima chalcona sintase em resposta à aplicação de AS.

Resultados semelhantes foram encontrados por Dong, Wan e Liang (2010), onde plantas de sálvia tratadas com AS apresentaram maior acúmulo de ácidos fenólicos e maior atividade enzimática da PAL. Gondor et al. (2016) também verificaram aumentos na atividade da PAL em resposta à aplicação da AS em plantas de trigo. No entanto, muito pouco é conhecido ou compreendido sobre o papel que o AS desempenha na regulação da atividade da PAL (CHEN et al., 2006) e sobre as relações entre AS, PAL e a biossíntese dos compostos fenólicos (DONG; WAN; LIANG, 2010). Aumentos na atividade da enzima CHS em plantas de gengibre

(GHASEMZADEH; JAAFAR; KARIMI, 2012) e *Centella asiatica* (IBRAHIM; OMAR; ZAIN, 2017) também foram verificados em respostas à aplicação de AS.

5.3.2.5 Atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico

A capacidade antioxidante é relacionada à presença de compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos danosos do estresse oxidativo (PEREZ et al., 2014). Um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante é a atividade sequestradora do radical livre sintético 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), sendo expresso pela concentração inibitória (CI_{50}), que representa a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH.

As plantas de *A. millefolium* tratadas com AS aos 100 DAP apresentaram reduções significativas nos valores de CI_{50} (19,5 e 34,4%, respectivamente, para os anos de 2016 e 2017) em relação às plantas controle (Tabela 17). Os menores valores de CI_{50} são uma indicativa da alta atividade antioxidante da planta (ARBOS et al., 2010). Tajik, Zarinkamar e Niknam (2015) mostraram que aplicação de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AS foi o tratamento mais efetivo no aumento da atividade antioxidante dos estigmas de açafrão (*Crocus sativus*) relacionada à maior concentração de crocina, um carotenóide único, com poderosa capacidade antioxidante, que distingue a cor amarela brilhante dos estigmas. Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de tomilho (PÉREZ-TORTOSA et al., 2012), funcho (GORNI et al., 2017) e gengibre (GHASEMZADEH et al. 2012) tratadas com AS apresentaram efeitos positivos na atividade antioxidante (menores valores de IC_{50}), detectados pelos métodos DPPH.

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos (ALVES et al., 2010) e a natureza de antioxidantes celular, torna-se necessário a utilização de outros métodos complementares para avaliar a atividade antioxidante das plantas. As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetivas e agir em diversas etapas do processo oxidativo, atuando por diferentes mecanismos (SILVA et al., 2010). O DPPH é o método padrão mais utilizado no mundo todo para essa finalidade. Porém, o DPPH é um radical sintético, não presente nos seres vivos. Desta maneira, são realizados outros testes *in vitro* para a avaliação da atividade

antioxidante, tais como os métodos TBARS (baseado na atividade antioxidante via ação enzimática para redução da peroxidação lipídica), FRAP (baseado na atividade antioxidante via redutor férrico e capacidade de quelação do íon ferro) e do óxido nítrico - NO (baseado na atividade antioxidante via ação de sequestro de radical livre).

A análise da lipoperoxidação pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) tem sido utilizada em estudos de estresse oxidativo em plantas, sendo um indicador da formação de EROS (SRIVASTAVA et al., 2005). O estresse oxidativo causa danos peroxidativos nos lipídios das membranas celulares, aumentando a produção de TBARS. Nas plantas tratadas com AS em ambas as épocas de aplicação houve aumentos das porcentagens de TBARS (11 e 10,4% respectivamente para os tratamentos T2 e T3) no ano de 2016. Em 2017, apenas as plantas tratadas com AS aos 20, 60 e 100 DAP apresentaram maior porcentagem de TBARS (2,2%), em comparação ao controle (Tabela 17). Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que a aplicação de AS em concentrações molares pode causar estresse oxidativo em plantas, produzindo EROS (HORVÁTH et al., 2007; GORNI; PACHECO, 2016). Resultados semelhantes encontrados por Pérez et al. (2014), mostraram que plantas de menta (*Mentha piperita*) tratadas com AS apresentaram efeitos positivos na atividade antioxidante TBARS.

O poder antioxidante determinado via método FRAP se baseia na habilidade de um composto em produzir Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} (VASCONCELOS et al., 2007). O extrato foliar das plantas tratadas com AS aos 100 DAP (ano de 2016) apresentou maior capacidade antioxidante via FRAP (2,25 e 9%). No segundo ano de cultivo, houve aumentos de 61 e 18% na atividade antioxidante, em ambas as épocas de aplicação do AS, em comparação ao extrato das plantas controle (Tabela 17). Resultados semelhantes foram observados em plantas de gengibre (GHASEMZADEH et al., 2012) e em plantas de laranja-azeda (SARROU et al., 2015) e morango (KUNDU et al., 2018), as quais quando tratadas com AS apresentaram maior atividade antioxidante detectadas pelo método FRAP.

A avaliação da atividade antioxidante das plantas de mil-folhas por meio da ação de substâncias sequestradoras do radical óxido nítrico (NO) também foi testada pela sua capacidade de remoção do nitrato pelo método de Griess. Os resultados obtidos no primeiro ano de cultivo demonstram que o extrato das plantas tratadas com AS em ambas as épocas de aplicação foi capaz de sequestrar o NO

com consequente aumento do conteúdo de nitrito formado (aumentos de 31,3 e 18% respectivamente). Já no segundo ano de cultivo, somente as plantas tratadas aos 20, 60 e 100 DAP apresentaram maior atividade antioxidante (119,3%) em relação às plantas controle (Tabela 17). Resultados semelhantes foram obtidos por Pérez et al. (2014), onde a aplicação de AS em plantas de menta resultou em aumento de 30% no sequestro de NO. Também Manivannan et al. (2016), ao avaliarem o sequestro do radical NO em plantas de *Scrophularia kakudensis* tratadas com MeJa e AS, verificaram maior atividade antioxidante.

Tabela 17 – Atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH, TBARS, FRAP e NO do extrato hidroalcoólico de plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico, em função da época de aplicação e ano de cultivo.

Tratamentos	Atividade antioxidante			
	DPPH		TBARS	
	(C ₅₀)		(%)	
	2016	2017	2016	2017
Controle	933,65a	618,18a	81,79b	85,58b
20, 60 e 100 DAP	994,83a	638,28a	90,71a**	87,45a*
100 DAP	751,83b**	405,39b**	90,25a	86,68ab
CV (%)	4,43	2,54	0,68	0,84
Tratamentos	FRAP		NO	
	(μmol Fe ²⁺ mg ⁻¹)		(μM nitrite mL ⁻¹)	
	2016	2017	2016	2017
Controle	0,89c	0,95c	14,37c	22,25b
20, 60 e 100 DAP	0,91b	1,53a**	18,87a**	48,79a**
100 DAP	0,97a**	1,12b	16,94b	25,98b
CV (%)	0,56	4,55	1,10	8,64

** e *: significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

5.3.2.6 Fatores climáticos

Os conteúdos fitoquímicos podem variar devido às condições climáticas (KUMAR et al., 2017). A interação química entre as plantas e o meio ambiente é mediada, principalmente, pela biossíntese de metabólitos secundários, os quais desempenham papéis biológicos como resposta adaptativa ao meio

ambiente (VERMA; SHUKLA, 2015; ALI; GOPALAKRISHNAN; VENKATESALU, 2017).

Os resultados desta pesquisa mostram que no ano de 2017, as plantas de mil-folhas apresentaram um maior teor e rendimento de óleo essencial. A biossíntese dos óleos essenciais é influenciada pelos fatores climáticos, tais como fotoperíodo, temperatura, umidade, precipitação e intensidade de radiação solar. Estes fatores abióticos podem determinar a época ideal de colheita ou o local de cultivo mais adequado, visando a obtenção de maiores quantidades de óleo essencial e do princípio ativo de interesse. A época de colheita também influencia a composição do óleo essencial de plantas aromáticas (SILVA et al., 2016).

Os fatores climáticos prevaletentes entre os dois anos de cultivo apresentaram variações, sendo que no ano de 2016 a precipitação foi concentrada nos meses de maio e junho, ocorrendo uma longa estiagem subsequente para novamente ocorrerem picos de chuva (53 mm) dias antes da colheita, promovendo aumentos nos teores de monoterpenos presentes no óleo essencial. Já no ano de 2017 houve um período concentrado de chuva no mês de maio e alguns picos no início de junho e depois houve um período prolongado de 13 dias de estiagem no mês de setembro, antes da colheita. Desta forma, houve aumento nos teores de sesquiterpenos e também maior teor e rendimento de óleo essencial. Este período de 13 dias sem chuva e consequente aumento da temperatura (32,9°C) causou efeitos significativos no teor e rendimento do óleo essencial e nos componentes do óleo essencial, desde que estudos relatam que a baixa quantidade de água e a temperatura elevada resultaram em aumentos no teor e rendimento de óleo essencial (ROWSHAN; BAHMANZADEGAN, 2013; JESHNI et al., 2014; GHASEMI et al., 2016). Tal fato pode explicar o maior teor e rendimento de óleo essencial da mil-folhas no ano de 2017, principalmente em plantas tratadas com AS, o que reforça a importância do ambiente sobre a resposta metabólica secundária da planta.

Entretanto, os teores de polifenóis, flavonóides, a atividade das enzimas PAL e CHS, e consequentemente a atividade antioxidante foram maiores no primeiro ano de cultivo (2016), quando houve precipitação perto da época de colheita. Pode-se observar que essa espécie demonstrou diferentes estratégias adaptativas frente aos longos períodos de estiagem que ocorreram em épocas distintas, aumentando os teores de metabólitos secundários de maneira diferente

dependendo do tipo de composto. As variações na precipitação e temperatura podem alterar significativamente os teores de metabólitos secundários (YAO et al., 2005). A partir do presente trabalho, demonstra-se que as condições agroclimáticas, tais como a temperatura e precipitação, exercem efeitos significativos sobre os fitoconstituintes em plantas de *A. millefolium* e seu potencial antioxidante, principalmente em plantas tratadas com AS.

5.4 Correlação de Pearson

Na Tabela 18 está demonstrada a análise de correlação, onde foram estabelecidas as correlações entre os teores dos produtos do metabolismo primário (açúcares, proteínas, aminoácidos e açúcares redutores) e secundário (óleo essencial, polifenóis, flavonóides, antocianinas e carotenóides), a atividade enzimática (PAL e CHS) e atividade antioxidante (DPPH, FRAP, TBARS e NO) em plantas de *A. millefolium* tratadas com AS em ambas as épocas de aplicação e os anos de cultivo. Foram utilizados os valores médios de ambos os tratamentos e ano de cultivo.

Os resultados demonstraram que os produtos do metabolismo primário apresentaram uma alta correlação positiva com os produtos do metabolismo secundário. O teor de açúcares solúveis totais - AST revelou uma alta correlação com os teores de proteínas solúveis totais - PST ($R^2 = 0,7592$), açúcares redutores totais - ART ($R^2 = 0,7116$), antocianinas - ANT ($R^2 = 0,9533$) e carotenóides - CAR ($R^2 = 0,9575$), e com as atividades antioxidantes por FRAP ($R^2 = 0,9419$), TBARS ($R^2 = 0,8946$) e NO ($R^2 = 0,8740$).

O teor de proteínas solúveis totais - PST apresentou correlação positiva com os teores de AAST ($R^2 = 0,9204$), ART ($R^2 = 0,8241$), a atividade das enzimas PAL ($R^2 = 0,9298$) e CHS ($R^2 = 0,9782$) os teores de compostos fenólicos totais - PFT ($R^2 = 0,9571$), flavonóides totais - FT ($R^2 = 0,9034$), ANT ($R^2 = 0,8436$) e CAR ($R^2 = 0,8522$) e com o teor de óleo essencial - TOE ($R^2 = 0,8559$) e rendimento de óleo essencial - ROE ($R^2 = 0,8970$).

O teor de aminoácidos solúveis totais - AAST apresentou correlação positiva com as atividades enzimáticas PAL ($R^2 = 0,8553$) e CHS ($R^2 = 0,9564$), teores de PFT ($R^2 = 0,9715$), FT ($R^2 = 0,9962$) e para TOE ($R^2 = 0,8681$) e ROE ($R^2 = 0,9030$).

Os resultados também evidenciam uma correlação entre o teor de açúcares redutores totais - ART com a atividade enzimática PAL ($R^2 = 0,6951$) e CHS ($R^2 = 0,7546$), PFT ($R^2 = 0,7063$), ANT ($R^2 = 0,7980$), CAR ($R^2 = 0,8076$) e óleo essencial – TOE ($R^2 = 0,8159$) e ROE ($R^2 = 0,7895$).

Entretanto, os resultados mostram que AST apresentou uma alta correlação com as atividades antioxidantes FRAP ($R^2 = 0,9419$), TBARS ($R^2 = 0,8946$) e NO ($R^2 = 0,8740$), ART para FRAP ($R^2 = 0,7472$) e TBARS ($R^2 = 0,8510$) e AAST para DPPH ($R^2 = -0,7340$) e TBARS ($R^2 = 0,7937$). Estudos mostram que existem compostos polifenólicos ligados a açúcares (glicosídeos), como exemplo, a rutina (HOSSEINZADEH; NASSIRI-ASL, 2014; GANESHPURKAR; SALUJA, 2017), o que pode ter explicado esta correlação alta entre açúcares e atividade antioxidante.

Houve correlação positiva entre a atividade enzimática da PAL e o teor de PFT ($R^2 = 0,9190$), FT ($R^2 = 0,8451$), ANT ($R^2 = 0,7680$), CAR ($R^2 = 0,7716$), TOE ($R^2 = 0,7298$) e ROE ($R^2 = 0,7680$) e a atividade enzimática CHS ($R^2 = 0,932$). Os mesmos resultados foram encontrados entre a atividade da CHS e PFT ($R^2 = 0,9876$), FT ($R^2 = 0,9444$), ANT ($R^2 = 0,7311$), CAR ($R^2 = 0,7432$), TOE ($R^2 = 0,8931$) e ROE ($R^2 = 0,9355$). As enzimas PAL e CHS, são as principais enzimas envolvidas na biossíntese dos compostos fenólicos e flavonóides. Estudos revelaram correlações positivas entre o aumento da atividade das enzimas PAL e CHS e os compostos fenólicos e flavonóides em plantas tratadas com AS (DONG; WAN; LIANG, 2010; IBRAHIM; OMAR; ZAIN, 2017).

As correlações diretas entre os teores de polifenóis totais e as atividades antioxidantes foram elevadas para DPPH ($R^2 = -0,7236$) e TBARS ($R^2 = 0,8346$), além de uma alta correlação entre FT ($R^2 = 0,9708$), ANT ($R^2 = 0,6673$), CAR ($R^2 = 0,6811$), TOE ($R^2 = 0,8879$) e ROE ($R^2 = 0,9211$). Correlações positivas significativas também foram evidenciadas entre os teores de flavonóides totais e atividade antioxidante DPPH ($R^2 = -0,7643$) e TBARS ($R^2 = 0,7673$) e óleo essencial – TOE ($R^2 = 0,8635$) e ROE ($R^2 = 0,8867$). Verificou-se também uma forte correlação entre os teores de antocianinas e carotenóides e as atividades antioxidantes FRAP ($R^2 = 0,9725$ e $0,9676$), TBARS ($R^2 = 0,9551$ e $0,9621$) e NO ($R^2 = 0,8693$ e $0,8594$).

No geral, os resultados do coeficiente de correlação indicam que o aumento dos metabólitos primários nas plantas de *A. millefolium* em resposta à aplicação do AS resultou em um maior acúmulo de produtos do metabolismo

secundário. A existência de correlação significativa entre flavonóides e ácidos fenólicos e com a atividade antioxidante das plantas permite concluir que um elevado conteúdo de polifenóis totais é um fator importante na determinação da atividade antioxidante destas plantas estudadas (GHASEMZADEH; JAAFAR; KAMIRI, 2012; IBRAHIM; OMAR; ZAIN, 2017). Desta maneira, foi possível inferir que a aplicação exógena de AS nas plantas desencadeou aumentos na atividade das enzimas PAL e CHS, com concomitantes aumentos na síntese e acumulação de compostos fenólicos. Estas correlações elevadas podem confirmar que os compostos fenólicos são os constituintes mais importantes na determinação da atividade antioxidante dos extratos de *Achillea millefolium* L.

Por outro lado, a atividade antioxidante não esteve relacionada somente à concentração de polifenóis na planta, desde que verificou-se também uma forte correlação entre o teor e rendimento de óleo essencial (TOE e ROE) e a atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH ($R^2 = -0,6902$ e $-0,6837$) e TBARS ($R^2 = 0,7155$ e $0,7656$).

As correlações negativas encontradas em relação ao teste DPPH, mesmo nas plantas com maiores teores de compostos fenólicos, é explicada pelo fato de que este teste se baseia na concentração inibitória (CI_{50}), na qual a relação é inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o teor de polifenóis totais menor é a CI_{50} .

Em geral, correlações positivas são observadas entre as atividades antioxidantes estudadas e os teores de polifenóis, flavonóides totais e antocianinas em plantas tratadas com AS (GHASEMZADEH; JAAFAR; KAMIRI, 2012; PÉREZ et al., 2014; SARROU et al., 2015; MONIVANNAM et al., 2016; JAVANMARDI; AKBAR, 2016).

Tabela 18 – Coeficiente de correlação (R²) entre metabólitos primários e secundários, atividade enzimática e atividade antioxidante de plantas de *Achillea millefolium* L. tratadas com ácido salicílico.

	AST	PST	AAST	ART	PAL	CHS	PFT	FT	ANT	CAR	TOE	ROE	DPPH	FRAP	TBARS	NO
AST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PST	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AAST	ns	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ART	*	**	ns	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAL	ns	**	**	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CHS	ns	**	**	*	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PFT	ns	**	**	*	**	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FT	ns	**	**	ns	**	**	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANT	**	**	ns	**	*	*	*	ns	-	-	-	-	-	-	-	-
CAR	**	**	ns	**	*	*	*	ns	**	-	-	-	-	-	-	-
TOE	ns	**	**	**	*	**	**	**	ns	ns	-	-	-	-	-	-
ROE	ns	**	**	*	**	**	**	**	ns	ns	**	-	-	-	-	-
DPPH	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	*	*	-	-	-	-
FRAP	**	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	**	**	ns	ns	ns	-	-	-
TBARS	**	**	*	**	**	**	**	*	**	**	*	*	ns	**	-	-
NO	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	ns	ns	ns	**	*	-

ns, * e ** - Coeficiente de correlação não significativo e significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade. AST - açúcares solúveis totais; PST - proteínas solúveis totais; ART - açúcares redutores totais; AAST - aminoácidos solúveis totais; PAL - fenilalanina amônia liase; CHS - chalcona sintase; PFT - polifenóis totais; FT - flavonóides totais; ANT – antocianinas; CAR – carotenóides; TOE - teor de óleo essencial; ROE - rendimento de óleo essencial; DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila; FRAP – atividade antioxidante de redução de ferro; NO – sequestro do radical óxido nítrico e TBARS – peroxidação lipídica.

5.5 Considerações finais

A utilização de AS como substância elicitadora em plantas de *Achillea millefolium* proporciona aumentos nos teores de metabólitos secundários tais como compostos fenólicos e óleo essencial além de apresentar aumentos no teor de camazuleno, que é um dos mais importantes compostos voláteis presentes no óleo essencial da espécie estudada. A atividade de enzimas chave relacionadas à síntese de compostos fenólicos (PAL e CHS) também é maior em resposta à elicitação, revelando uma ação elicitadora direta. A ação elicitadora indireta também foi evidenciada por alterações marcantes nos níveis de metabólitos primários, tais como aminoácidos, proteínas e carboidratos, os quais são precursores das vias de metabolismo secundário. A maior presença destes compostos orgânicos pode estar relacionada à maior biomassa aérea e radicular das plantas. Concomitantemente às respostas de elicitação, foram evidenciados também os efeitos hormonais do AS nas plantas tratadas, tais como, aumentos de pigmentos e do processo fotossintético, resultando em maior crescimento.

Portanto, os resultados deste estudo discordam em parte das afirmações de Broeckling et al. (2005) de que os carboidratos produzidos pelas plantas são prioritariamente consumidos para produção de energia para suportar a biossíntese de metabólitos secundários, devido à elicitação. No presente estudo, os estímulos causados pelo AS foram capazes de promover alterações no metabolismo celular, induzindo a uma série de reações coordenadas entre si que culminaram com o aumento dos teores de metabólitos primários e secundários. Demonstrou-se que a espécie *Achillea millefolium* apresenta respostas positivas à aplicação de ácido salicílico, tornando viável a utilização deste elicitador no cultivo comercial desta espécie.

6 CONCLUSÃO

A aplicação foliar de AS influenciou positivamente tanto o metabolismo primário como o metabolismo secundário nas plantas de *Achillea millefolium*. Os resultados desta pesquisa nos levam a afirmar o efeito positivo da aplicação de 1,0 mmol L⁻¹ de AS na pré-colheita (aos 100 DAP), tornando-se viável à aplicação deste elicitor no cultivo comercial desta espécie medicinal, visando uma maior produtividade e uma maior concentração de compostos secundários com potencial antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ACHAKZAI, A. K. K. et al. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in quetta. **Pakistan Journal of Botany**, Paquistão, v. 41, n. 5, p. 2129–2135, out. 2009.
- AGARWAL, S. et al. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 49, n. 4, p. 541-550, mar. 2005.
- AHMAD, I.; BASRA, S. M. A.; WAHID, A. Exogenous application of ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide improves the productivity of hybrid maize at low temperature stress. **International Journal of Agriculture & Biology**, Paquistão v. 16, n. 4, p. 825-830, mar. 2014.
- ALI, R. M.; ABBAS, H. M. Response of salt stress barley seedlings to phenylurea. **Plant Soil and Environment**, República Checa, v. 49, n. 4, p.158–162, out. 2003.
- ALI, M. et al. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 25, n. 6, p. 613-620, fev. 2006.
- ALI, S. I.; GOPALAKRISHNAN, B.; VENKATESALU, V. Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achillea millefolium* L.: A Review. **Phytotherapy Research**, Estados Unidos, v. 31, n. 8, p. 1140-1161, mai. 2017.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, out. 2010.
- AMIN, A. A.; RASHAD, M.; EL-ABAGY, H. M. H. Physiological effect of indole-3-butyric acid and salicylic acid on growth, yield and chemical constituents of onion plants. **Journal Applied Science Research**, Faisalabad, v. 3, n. 11, p. 1554-1563, jan. 2007.
- ANDENBERG, A. A. et al. **Flowering Plants Eudicots Asterales**. The Families and Genera of Vascular Plants, K. Kubitzki (Ed.). Springer – Verlag. v.8, p. 61- 588. 2007.
- APPLEQUIST, W. L.; MOERMAN, D. E. Yarrow (*Achillea millefolium* L.): a neglected panacea? A review of ethnobotany, bioactivity, and biomedical research. **Economic Botany**, Bronx, v. 65, n. 2, p. 209- 225, abr. 2011.
- ARBOS, K. A. et al. Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 501-506, abr.-jun. 2010.

ARFAN, M.; ATHAR, H. R.; ASHRAF, M. Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress?. **Journal of Plant Physiology**, Países Baixos, v.164, n. 6, p. 685-694, jun. 2007.

ASIMI, O. A.; SAHU, N. P.; PAL, A. K. Antioxidant capacity of crude water and ethylacetate extracts of some Indian species and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nigéria, v. 7, n. 26, p. 1907–1915, jul. 2013.

ASKARI, E.; EHSANZADEH, P. Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid and their interactive effects on physiological characteristics of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum**, Polônia, v. 37, n. 2, p. 01-14, jan. 2015.

BAGHERIFARD, A. et al. The effect of salicylic acid on some morphological and biochemistry parameters under salt stress in herb artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Research Journal of Fisheries and Hydrobiology**, Jordan, v. 10, n. 10, p. 745-750, jun. 2015.

BANDURSKA, H. Salicylic acid: An update on biosynthesis and action in plant response to water deficit and performance under drought. In: HAYAT, S.; AHMAD, A.; ALYEMENI, M. (eds) Salicylic Acid. Springer, Dordrecht, 2013, p. 1-14.

BARAKAT, N. A. M. Oxidative stress markers and antioxidant potential of wheat treated with phytohormones under salinity stress. **Journal of Stress Physiology and Biochemistry**, Sibéria, v. 7, n. 4, p. 250–267, set. 2011.

BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-23, mar./apr. 2010.

BAYTOP, T. **Treatment with plants in Turkey**. Istanbul University Publications No: 3255:40, Istanbul, 1999, 176p.

BENEDEK, B. et al. Choleric effects of yarrow (*Achillea millefolium* sl) in the isolated perfused rat liver. **Phytomedicine**, Estugarda, v. 13, n. 9-10, p. 702-706, nov. 2006.

BENEDEK, B.; KOPP, B. *Achillea millefolium* L. revisited: recent findings confirm the traditional use. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, Wien, v. 157, n. 13-14, p. 312-314, mai. 2007.

BENEDEK, B.; KOPP, B.; MELZIG, M. F. *Achillea millefolium* L. s.l. – Is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition?. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 113, n. 2, p. 312–317, jun. 2007.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas**: noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 42 p. 2003.

BERLYN, G. P.; CHO, J. Light, moisture, and nutrient use by plants. In: ASHTON, M.S., MONTAGNINI, F. (Eds.) **The silvicultural basis for agroforestry systems**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p.9-39

BETTAIEB, I. et al. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. **Acta Physiologiae Plantarum**, Polônia, v. 33, n. 4, p. 1103-1111, jul. 2011.

BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. **Métodos de análises químicas em plantas**. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 149 p. 2004.

BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. Análises Bioquímicas e Físico-Químicas em Pós-Colheita. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (Org.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, p. 441-472, 2006.

BHUPINDER, S.; USHA, K. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 137-141, fev. 2003.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 181, n. 4617, p. 1199- 1200, abr. 1958.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n. 2, p. 123-130, mai.-ago.1999.

BOBIS, O. et al. Influence of phytochemical profile on antibacterial activity of different medicinal plants against gram-positive and gram-negative bacteria. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Nova Iorque, v. 51, n. 1, p. 113-118, jan. 2015.

BORGES, C. V. et al. Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites. In: **Medicinal Plants and Environmental Challenges**. Springer, Cham, 2017. p. 259-277.

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**, Nova Iorque, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, mai. 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie – Food Science and Technology**, Londres, v. 28, n. 1, p. 25-30, jun. 1995.

BRANT, R.S. et al. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1401-1407, ago. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <<http://189.28.128.100/portal/saude/profissional/vi>>. Acesso em: 03 dez. 2015.

BROECKLING, C. D. et al. Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 410, p. 323-336, jan. 2005.

BURG, M. B., FERRARIS, J. D. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 12, p. 7309–7313, mar. 2008.

BURNS, J. et. al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago: v.49, n. 12, p. 5797-5808, out. 2001.

CABRERA, C.; GIMENEZ, R.; LOPEZ, C. M. Determination of tea components with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n. 15, p. 4427-4435, jun. 2003.

CARNEIRO, R. F. et al. **Crescimento de gergelim submetido a estresse hídrico e à aplicação foliar de ácido salicílico**. Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia, 2015.

CHAKRABORTY, N. et al. Abiotic elicitors mediated elicitation of innate immunity in tomato: an *ex vivo* comparison. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Índia, v. 22, n. 3, p. 307-320, jul. 2016.

CHEN, J. Y. et al. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. **Postharvest Biology and Technology**, Países Baixos, v. 40, n. 1, p. 64-72, abr. 2006.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 6. ed. Petrópolis: Vozes, 2003. 248p.

COUÉE, I. et al. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 449–459, fev. 2006.

CRAWLY, M.J. **Plant ecology**. Crawly, M.J. (ed). Blackwell Science, Oxford, 2001. 703p.

DAT, J. F. et al. Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 156, n. 5-6, p. 659-665, mai. 2000.

DAWOOD, M. G.; SADAK, M. S.; HOZAYEN, M. Physiological role of salicylic acid in improving performance, yield and some biochemical aspects of sunflower plant grown under newly reclaimed sandy soil. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Jordan, v. 6, n. 4, p. 82-89, 2012.

- DIVYA, P.; PUTHUSSERI, B.; NEELWARNE, B. The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compounds in foliage of coriander. **Food Science and Technology**, London, v.56, n. 1, p.101-110, abr. 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**, Amsterdam, v.148, n. 2-3, p. 99-104, mai. 2010.
- DONG, M. A.; FARRÉ, E. M.; THOMASHOW, M. F. Circadian clock-associated 1 and late elongated hypocotyl regulate expression of the C-repeat binding factor (CBF) pathway in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 17, p. 7241-7246, abr. 2011.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and relates substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, mar. 1956.
- DUČAIOVÁ, Z.; PETRUĽOVÁ, V.; REPČÁK, M. Salicylic acid regulates secondary metabolites content in leaves of *Matricaria chamomilla*. **Biologia**, Santiago, v. 68, n. 5, p. 904-909, ago. 2013.
- EDREVA, A. et al. Field-cultivated medicinal plants of *Achillea millefolium* group: a source of bioactive compounds. **Genetics and Plant Physiology**, Bulgária, v. 7, n. 1-2, p. 22-33, mai. 2017.
- EL-BELTAGI, H. S. et al. Effect of salicylic acid and potassium citrate on cotton plant under salt stress. **Fresenius Environmental Bulletin**, Alemanha, v. 26, n. 1a, p. 1091-1100, fev. 2017.
- EL-TAYEB, M. A. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 45, n. 3, p. 215–224, mar. 2005.
- ESMAELLI, M.; HEIDARZADE, A.; ZEINALI, A. Alterations in content of phenolic acids and growth parameters of two rice (*Oryza sativa*) cultivars in response to salicylic acid under abiotic stress. **International Journal of Farming and Allied Sciences**, Paquistão, v. 4, n. 2, p. 119-124, fev. 2015.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação do solo**. 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 2006, 306p.
- FAHAD, S.; BANO, A. Effect of salicylic acid on physiological and biochemical characterization of maize grown in saline area. **Pakistan Journal of Botany**, Paquistão, v. 44, n. 4, p. 1433-1438, ago. 2012.
- FARIAS, A. T. V. **Crescimento e desenvolvimento do algodoeiro em função de doses de silício e ácido salicílico**. 2012. 63f. Dissertação (Mestrado) –

Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Campina Grande.

FAVARIN, J. L. et al. Equações para a estimativa do índice de área foliar do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 769-773, jun. 2002.

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

FIERASCU, I. et al. *In vitro* antioxidant and antifungal properties of *Achillea millefolium* L. **Romanian Biotechnological Letters**, Romênia, v. 20, n. 4, p. 10626-10636, jan. 2015.

FLORA DO BRASIL 2020. **Asteraceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB55>>. Acesso em: 21 nov. 2018

FOTI, M. et al. Antioxidant activity of phenolic meroditerpenoids from marine algae. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Países Baixos, v. 26, n. 2, p. 159–164, nov. 1994.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as Food Colors**, Nova Iorque, Academic Press, 1982, p.182-205.

GADI, B. R.; LAXMI, V. Effect of salicylic acid and moisture stress on sugar content and sucrose synthase activity in *Ziziphus* seedlings. **Biochemical and Cellular Archives**, Índia, v. 12, n. 1, p. 21–24, jan. 2012.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The pharmacological potential of rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Arábia Saudita, v. 25, n. 2, p. 149–164, fev. 2017.

GEORGIEVA, L. et al. *Achillea millefolium* L. –phytochemical profile and in vitro antioxidant activity. **International Food Research Journal**, Malásia, v. 22, n. 4, p. 1347-1352, dez. 2015.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, Nova Iorque, v. 126, n. 1, p. 131-138, out. 1982.

GHANATI, F. et al. Production of new active phytochemicals by *Achillea millefolium* L. after elicitation with silver nanoparticles and methyl jasmonate. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, Bhopal, v. 11, n. 2, p. 391-399, set. 2014.

GHARIB, F. A. L. Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. **International Journal of Agriculture and Biology**, Paquistão, v. 8, n. 4, p. 294–301, jan. 2007.

GHASEMI, M. et al. The evaluation of exogenous application of salicylic acid on physiological characteristics, proline and essential oil content of chamomile

(*Matricaria chamomilla* L.) under normal and heat stress conditions. **Agriculture**, Suíça, v. 6, n. 3, p. 31, jul. 2016.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z.; KARIMI, E. Involvement of salicylic acid on antioxidant and anticancer properties, anthocyanin production and chalcone synthase activity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) varieties. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 13, n. 11, p. 14828-14844, dez. 2012.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. Effect of salicylic acid application on biochemical changes in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Journal of Medicinal Plants Research**, Kenya, v. 6, n. 5, p. 790-795, fev. 2012.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. Interactive effect of salicylic acid on some physiological features and antioxidant enzymes activity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Molecules**, Basel, v. 18, n. 5, p. 5965-5979, mai. 2013.

GHASEMZADEH, A. et al. Changes in phytochemical synthesis, chalcone synthase activity and pharmaceutical qualities of Sabah snake grass (*Clinacanthus nutans* L.) in relation to plant age. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 11, p. 17632-17648, nov. 2014.

GIBSON, S. I. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 1, p. 93–102, mar. 2005.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909–930, dez. 2010.

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

GONÇALVES, F. C. D. M. **Menta (*Mentha x piperita* L.) cultivada com aplicação de ácido salicílico: avaliações fotossintéticas e bioquímicas**. 2017. 127f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.

GONDOR, O. K. et al. Salicylic acid induction of flavonoid biosynthesis pathways in wheat varies by treatment. **Frontiers in Plant Science**, Suíça, v. 7, p. 1447, 2016.

GONZALI, S.; MAZZUCATO, A.; PERATA, P. Purple as a tomato: towards high anthocyanin tomatoes. **Trends in Plant Sciences**, Cambridge, v. 14, n. 5, p. 237–241, set. 2009.

GORNI, P. H.; PACHECO, A. C. Growth promotion and elicitor activity of salicylic acid in *Achillea millefolium* L. **African Journal of Biotechnology**, Quênia, v. 15, n. 16, p. 657-665, abr. 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, e2016172, mai. 2017.

GRAMZA, A.; KORCZAK, J. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 16, n. 8, p. 351-358, ago. 2005.

GUIMARÃES, R. et al. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 99-106, jan. 2010.

GUNES, A. et al. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 164, n. 6, p. 728-736, jun. 2007.

HAAS, C. J. T.; GONZÁLEZ, G. A.; SAAVEDRA, A. L. Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de la raíz y biomasa total de plántulas de trigo. **Terra Latinoamericana**, Chapingo, v. 33, n. 1, p. 63-68, jan.-mar. 2015.

HAIR, J. F. et al. **Análise multivariada de dados**. Porto Alegre. Bookman, 2009.

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, n. 2, p. 281-291, nov. 2012.

HAYAT, S.; ALI, B.; AHMAD, A. Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. In: **Salicylic acid: A plant hormone**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 1-14.

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

HEGAZI, A. M.; EL-SHRAYI, A. M. Impact of salicylic acid and paclobutrazol exogenous application on the growth, yield and nodule formation of common bean. **Australian Journal of Basic and Applied Science**, Jordan, v. 1, n. 4, p. 834-840, jan. 2007.

HERNÁNDEZ, A. M.; PRIETO GONZÁLES, E.A. Plantas que contienen polifenoles: Antioxidantes dentro del estilo de vida. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, Habana v.18, n.1, p. 12-14, out. 1999.

HERRERA-VÁSQUEZ, A.; SALINAS, P.; HOLUIGUE, L. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. **Frontiers in Plant Science**, Suíça, v. 6, n. 171, p. 1-9, mar. 2015.

HORVÁTH, E. et al. Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 51, n. 3, p. 480-487, set. 2007.

- HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **Journal of Endocrinological Investigation**, Estados Unidos, v. 37, n. 9, p. 783-788, set. 2014.
- HUANG, C. et al. Effects of exogenous salicylic acid on the physiological characteristics of *Dendrobium officinale* under chilling stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 79, n. 2, p. 199-208, jun. 2016.
- HUO, C. H. et al. Cytotoxic flavonoids from the flowers of *Achillea millefolium*. **Chemistry of Natural Compounds**, Nova Iorque, v. 48, n. 6, p. 958-962, jan. 2013.
- HUSSEIN, M. M.; BALBAA, L. K.; GABALLAH, M. S. Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Paquistão, v. 3, n. 4, p. 321-328, jan. 2007.
- IBRAHIM, M. H. et al. The relationship between phenolics and flavonoid production with total non structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* Benth. under high CO₂ and nitrogen fertilization. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 1, p. 162-174, dez. 2011.
- IBRAHIM, M. H.; OMAR, H.; ZAIN, N. A. M. Salicylic acid enhanced photosynthesis, secondary metabolites, antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity (LOX) in *Centella asiatica*. **Annual Research & Review in Biology**, Índia, v. 17, n. 4, p. 1-14, set. 2017.
- JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. et al. Plants as biofactories: physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 12, p. 6583-6593, mai. 2011.
- JANDA, T. et al. Salicylic acid and photosynthesis: signaling and effects. **Acta Physiologia Plantarum**, Polônia, v. 36, n. 10, p. 1-10, out. 2014.
- JAVANMARDI, J.; AKBARI, N. Salicylic acid at different plant growth stages affects secondary metabolites and physico-chemical parameters of greenhouse tomato. **Advances in Horticultural Science**, Itália, v. 30, n. 3, p. 151-157, ago. 2016.
- JESHNI, M. G. et al. The changes of yield and essential oil components of German Chamomile (*Matricaria recutita* L.) under application of phosphorus and zinc fertilizers and drought stress conditions. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, Arábia Saudita, v. 16, n. 1, p. 60-65, jan. 2017.
- JOSEPH, B.; JINI, D.; SUJATHA, S. Insight into the role of exogenous salicylic acid on plants grown under salt environment. **Asian Journal of Crop Science**, Paquistão, v. 2, n. 4, p. 226-235, abr. 2010.
- KARORI, S. M. et al. Antioxidant capacity of different types of tea products. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 19, p. 2287-2296, out. 2007.

- KAZEMI, M. Foliar application of salicylic acid and methyl jasmonate on yield, yield components and chemical properties of tomato. **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, Jordânia, v. 10, n. 4, p. 771-778, dez. 2014.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KESER S, et al. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of water and ethanol extracts from *Achillea millefolium* L. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, Turquia, v. 10, n. 3, p. 385–392, nov. 2013.
- KESSMANN, H. et al. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.): V. Constitutive and elicitor-induced accumulation of isoflavonoid conjugates in cell suspension cultures. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 94, n. 1, p. 227-232, jun. 1990.
- KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 160, n. 5, p. 485-492, jun. 2003.
- KHAN, S. U.; BANO, A.; GURMANI, A. R. Abscisic acid and salicylic acid seed treatment as a potent inducer of drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Pakistan Journal of Botany**, Paquistão, v. 44, n. 1, p. 43–49, mar. 2012.
- KHANDAKER, L.; AKOND, A. M.; OBA, S. Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaf's bioactive compounds in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.). **Vegetable Crops Research Bulletin**, Alemanha, v. 74, p. 77-86, ago. 2011.
- KIDDLE, G. A.; DOUGHTY, K. G.; WALLSGROVE, R. M. Salicylic acid -induced accumulation of glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 1343-1346, set. 1994.
- KIM, Y.; KIM, S.; SHIM, I. S. Exogenous salicylic acid alleviates salt-stress damage in cucumber under moderate nitrogen conditions by controlling endogenous salicylic acid levels. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, Coréia do Sul, v. 58, n. 3, p. 247-253, jun. 2017.
- KRASAVINA, M. S.; BURMISTROVA, N. A. Impact of salicylic acid on the transport and distribution of sugars in plants. In: **Salicylic Acid**. Springer Netherlands, 2013. p. 83-117.
- KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus***: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. 2007. 140p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- KUKIĆ, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 2, p. 861-868, mar. 2008.

KUMAR, S. et al. Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm. f. **BMC Research Notes**, Londres, v. 10, n. 1, p. 60, jan. 2017.

KUNDU, M.; HALDER, S.; BHATTACHARJEE, A. Salicylic acid-induced modulation of growth and metabolism of a medicinal plant *Mentha spicata* L. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Índia, v. 9, n. 12, p. 5294-5300, dez. 2018.

LARQUÉ-SAAVEDRA, A.; MARTÍN-MEX, R. Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants. p. 15-24, 2007. In HAYAT, S.; AHMAD, A. eds. **Salicylic acid a plant hormone**. Springer. Dordrecht, The Netherlands. 401 p.

LEUNG, A. Y. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics**. John Wiley, Nova Iorque, 1980, 409p.

LIMA, M. C. et al. Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos em *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 45-50, jan. 2011.

LIU, C. et al. Effects of cadmium and salicylic acid on growth, spectral reflectance and photosynthesis of castor bean seedlings. **Plant and Soil**, Países Baixos, v. 344, n. 1-2, p. 131-141, jul. 2011.

LOGEMANN, E. et al. UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, n. 4, p. 1903–1907, fev. 2000.

LORENZI, H. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1088p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos, 1997. p.115-230.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 233-252, jul.-dez. 2004.

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. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 17, n. 3, p. 1-13, mar. 2016.

MARCOCCI, L. et al. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract Egb761. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 201, n. 2, p. 748-55, jun. 1994.

MARKHAN, K. R. et al. An increase in the luteolin:apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. **Phytochemistry**, Nova Iorque, v. 48, n. 5, p. 791-794, jul. 1998.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. 5. ed. Viçosa, MG: UFV, 2000.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre-and post-harvest conditions: A review. **Food Chemistry**, Barking, v. 211, p. 41-50, nov. 2016.

MAZARO, S. M. et al. Qualidade pós-colheita de acerolas tratadas com ácido salicílico. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 10, n. 4, p. 512-517, set. 2015.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11, jan.-jun. 2002.

MÉTRAUX, J. P. Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 8, p. 332-334, ago. 2002.

MISHRA, A.; CHOUDHURI, M. A. Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane degradation mediated by lipoxygenase in rice. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 42, n. 3, p. 409-415, nov. 1999.

MOHAMED, R. A.; ABDELBASET, A. K.; ABD-ELKADER, D. Y. Salicylic acid effects on growth, yield, and fruit quality of strawberry cultivars. **Journal of Medicinally Active Plants**, Manhattan, v. 6, n. 3, p. 1-11, fev. 2018.

MOHAMMADHOSSEINI, M.; SARKER, S. D.; AKBARZADEH, A. Chemical composition of the essential oils and extracts of *Achillea* species and their biological activities: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, Países Baixos, v. 199, p. 257-315, mar. 2017.

MOHAREKAR, S.T. et al. Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong caryopsis. **Photosynthetica**, Prague, v. 41, n. 2, p. 315-317, jun. 2003.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, Santa Maria, v. 21, n. 4, p. 467-469, out. 1998.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, nov. 2006.

MOUSTAFA, E.; WONG, E. Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soybean seed. **Phytochemistry**, Países Baixos, v. 6, n. 5, p. 625-632, mai. 1967.

MUNNÉ-BOSCH, S.; PEÑUELAS, J. Photo-and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. **Planta**, Berlin, v. 217, n. 5, p. 758-766, set. 2003.

MUTHULAKSHMI, S.; LINGAKUMAR, K. Salicylic acid induced responses on growth and biochemical constituents in (*Vigna mungo* L.) Hepper. **European Journal of Experimental Biology**, Índia, v. 6, n. 1, p. 9-14, jan. 2016.

MUTLU, S.; ATICI, Ö.; NALBANTOGLU, B. Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, n. 2, p. 334-338, jun. 2009.

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

NAZAR, R. et al. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfuras similation and antioxidante metabolism differentially in two mungbean cultivars. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 168, n. 8, p. 807-815, mai. 2011.

NAZAR, R.; UMAR, S.; KHAN, N. A. Exogenous salicylic acid improves photosynthesis and growth through increase in ascorbate-glutathione metabolism and S assimilation in mustard under salt stress. **Plant Signaling & Behavior**, Estados Unidos, v. 10, n. 3, p. e1003751, mar. 2015.

NETTO, S. P.; RAFFAELLI, G. Produção experimental de mil folhas (*Achillea millefolium* L.), visando à extração de óleo essencial. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 2, n. 3, p. 27-31, set. 2004.

OCHOA-VELASCO, C. E. et al. Biotic and abiotic factors to increase bioactive compounds in fruits and vegetables. In: **Food Bioconversion**. 2017. p. 317-349.

OLIVEIRA, L. E. M.; MESQUITA, A. C.; FREITAS, R. B. **Análise de crescimento de plantas**. Lavras: Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. 2002.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, Essex, v. 74, p. 10-36, ago. 2015.

PACHECO, A. C. et al. Salicylic acid induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants. **Journal of Medicinal Plant Research**, Nigéria, v. 7, n. 42, p. 3158-3163, nov. 2013.

PEOPLES, M. B. et al. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra: Australian International Center of Agricultural Research, 1989, 76p.

PEREIRA, A. R.; NOVA, N. A. V.; SEDIYAMA, G. C. **Evapo (transpi) razão** (Vol. 183). Piracicaba: fealq. 1997. 183p.

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**, Barking, v.156, p. 273–278, ago. 2014.

PÉREZ-BURILLO, S. et al. Effect of brewing time and temperature on antioxidant capacity and phenols of white tea: Relationship with sensory properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 248, p. 111-118, mai. 2018.

PÉREZ-TORTOSA, V. et al. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. **Food Chemistry**, Barking, v. 130, n. 2, p. 362–369, jan. 2012.

RAI, V. K. Role of amino acids in plant responses to stresses. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 45, n. 4, p. 481–487, dez. 2002.

RAIJ, B. van et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas, Instituto Agronômico de Campinas, 2001. 285p.

RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 439-463, jun. 1992.

RIVAS-SAN VICENTE, M.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 10, p. 3321-3338, jun. 2011.

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

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan. 2007.

ROWSHAN, V.; KHOI, M. K.; JAVIDNIA, K. Effects of salicylic acid on quality and quantity of essential oil components in *Salvia macrosiphon*. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, Dacca, v. 4, n. 11, p. 77–82, jan. 2010.

ROWSHAN, V.; BAHMANZADEGAN, A. Effects of salicylic acid on essential oil components in Yarrow (*Achillea millefolium* Boiss). **International Journal of Basic Sciences and Applied Research**, v. 2, p. 347-351, 2013.

SAHARKHIZ, M. J.; GOUDARZI, T. Foliar application of salicylic acid changes essential oil content and chemical compositions of peppermint (*Mentha piperita* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Reino Unido, v. 17, n. 3, p. 435–440, ago. 2014.

SAITO, K. et al. The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: structural and genetic diversity. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 72, p. 21-34, nov. 2013.

SAKHABUTDINOVA, A. R. et al. Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 21, n. Especial, p. 314–319, jan. 2003.

SALLAM, A. M.; IBRAHIM, H. I. Effect of grain priming with salicylic acid on germination speed, seedling characters, anti-oxidant enzyme activity and forage yield of teosinte. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Dubai, v. 15, n. 5, p. 744-753, 2015.

SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**, Reino Unido, v. 6, p. 29265, jul. 2016.

SARANGTHEM, K.; SINGH, T. N. Efficacy of salicylic acid on growth, nitrogen metabolism and flowering of *Phaseolus vulgaris*. **Crop Research-Hisar**, Índia, v. 26, n. 2, p. 355-360, 2003.

SARROU, E. 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**, Reino Unido, v. 27, n. 6, p. 487-496, jul. 2015.

SCALON, S. P. Q. et al. Desenvolvimento de mudas de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e sombreiro (*Clitoria fairchildiana*) sob condições de sombreamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p.166-169, jan. 2006.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-248.

SEDAGHATHOOR, S.; KOJEIDI, M. I.; POORMASSALEGOO, A. Study on the effect of brassinolide and salicylic acid on vegetative and physiological traits of *Aloe maculata* All. in different substrates in a pot experiment. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, Alemanha, v. 6, p. 111-118, set. 2017.

SHAKIROVA, F. M. et al. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. **Plant Science**, Limerick, v. 164, n. 3, p. 317–322, mar. 2003.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of Functional Foods**, Países Baixos, v. 18, n. B, p. 820-897, out. 2015.

SILVA, M. L. C, et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul-set. 2010.

SILVA, S. et al. Effect of salicylic acid on essential oil compounds of *Melissa officinalis* *in vitro* plants. **Revista Agropecuária Técnica**, Paraíba, v. 35, n. 1, p. 178-184, jan. 2014.

SILVA, E. A. J. et al. Harvest time on the content and chemical composition of essential oil from leaves of guava. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 10, p. 1771-1776, out. 2016.

SILVA JÚNIOR, J. M. et al. Variações anatômicas de *Laelia purpurata* var. *cárnea* cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades e qualidade spectral de luz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 3, p. 480-486, mar. 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6. Ed., Porto Alegre - RS: Editora UFRGS; Florianópolis –SC: Editora da UFSC, 2007.

SINGH, B.; USHA, K. Salicylic acid-induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. **Journal of Plant Growth Regulators**, Nova Iorque v. 39, n. 2, p. 137-141, fev. 2003.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, mar./abr. 2007.

SRIVASTAVA, M. et al. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 415, p. 1335-1342, mai. 2005.

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**, Oxford, v. 50, n. 11, p. 4115-4124, nov. 2012.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 10, n. 1, p. 18, jan. 2011.

STATSOFT, I. N. C. **Statistica for Windows (computer program manual)**. Statsoft Inc., Tulsa, OK (EUA), 2017.

TADIĆ, V. et al. The estimation of the traditionally used yarrow (*Achillea millefolium* L. Asteraceae) oil extracts with anti-inflammatory potential in topical application. **Journal of Ethnopharmacology**, Países Baixos, v. 199, p. 138-148, mar. 2017.

TAGHVAEI, M.; JAFARI, S. M. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. **Journal of Food Science and Technology**, Índia, v. 52, n. 3, p. 1272-1282, mar. 2015.

TAGUCHI, G. et al. Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyl transferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 268, n. 14, p. 4086-4094, dez. 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 321-46, jun. 2007.

TAJIK, S.; ZARINKAMAR, F.; NIKNAM, V. Effects of salicylic acid on carotenoids and antioxidant activity of saffron (*Crocus sativus* L.). **Applied Food Biotechnology**, Irã, v. 2, n. 4, p. 33-37, set. 2015.

TONEL, F. R. et al. Salicylic acid: physiological and biochemical changes in seeds and maize seedlings subjected to salt stress. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 457-465, ago. 2013.

TROUBA, K. J. et al. Oxidative stress and its role in skin disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, Estados Unidos, v. 4, n. 4, p. 665-673, ago. 2002.

TUCUCH-HAAS, C. J. et al. Effect of salicylic acid on growth, nutritional status, and performance of maize (*Zea mays*). **Agrociencia**, Chapingo, v. 51, n. 7, p. 771-781, jan. 2017.

TUNA, A. L. et al. Comparative effects of various salicylic acid derivatives on key growth parameters and some enzyme activities in salinity stressed maize (*Zea Mays* L.) plants. **Pakistan Journal of Botany**, Paquistão, v. 39, n. 3, p. 787-798, fev. 2007.

VALENTE, L. M. M. et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 12, p. 216-223, abr.-jun. 2006.

VANACKER, H. et al. A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Cambridge, v. 28, n. 2, p. 209-216, dez. 2001.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, out. 2007.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, Alemanha, v. 2, n. 4, p. 105-113, dez. 2015.

VILLANUEVA-BERMEJO, D. et al. Selective precipitation of phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. extracts by supercritical anti-solvent technique. **The Journal of Supercritical Fluids**, Virgínia, v. 120, n. 1, p. 52-58, fev. 2017.

VRIES, J.; ARCHIBALD, J. M. Plant evolution: Landmarks on the path to terrestrial life. **New Phytologist**, Reino Unido, v. 217, n. 4, p. 1428-1434, jan. 2018.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer Verlag, Berlim, 384 p. 1996.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 144, n. 3, p. 307-313, set. 1994.

WILLUHN, G. **Millefolii herba**. In: WICHTL, M. (Ed.), Teedrogen und Phytopharmaka, fourth ed. Wiss. Verl-Ges, Stuttgart, pp. 399– 403. 2002.

WINK, M. **Secondary metabolites, the role in plant diversification**. Academic press: Encyclopedia of Evolutionary Biology. Ed. 1, 2016, 2132p.

YALPANI, N. et al. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid and pathogenesis related proteins and virus resistance in tobacco. **Planta**, Berlin, v. 193, n. 3, p. 373–376, abr. 1994.

YAO, L. et al. Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 16, p. 6477-6483, jul. 2005.

YAO, X. et al. *In vivo* and *in vitro* antioxidant activity and α -glucosidase, α -amylase inhibitory effects of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds. **Food Chemistry**, Barking, v. 139, n. 1-4, p. 59-66, jan. 2013.

YILDIRIM, E.; TURAN, M.; GUVENC, I. Effect of foliar salicylic acid applications on growth, chlorophyll, and mineral content of cucumber grown under salt stress. **Journal of Plant Nutrition**, Estados Unidos, v. 31, n. 3, p. 593-612, mar. 2008.

YUKIMUNE, Y. et al. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. **Nature Biotechnology**, Nova Iorque, v. 14, n. 9, p. 1129–1132, set. 1996.

ZHANG, C. et al. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag⁺ elicitation and nutrient feeding. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n. 2, p. 147–151, jan. 2004.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Lancaster, v.40, n. 5, p.779-784, set. 1965.

ANEXOS

ANEXO A – Exsicata da espécie estudada (*Achillea millefolium* L.)

ANEXO B – Croqui do experimento.

