

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E ATIVIDADE ELICITORA DO ÁCIDO
SALICÍLICO EM *Achillea millefolium* L.**

PEDRO HENRIQUE GORNI

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E ATIVIDADE ELICITORA DO ÁCIDO
SALICÍLICO EM *Achillea millefolium* L.**

PEDRO HENRIQUE GORNI

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pacheco Santos

581.634
G671p

Gorni, Pedro Henrique

Promoção de crescimento e atividade elicitora do Ácido Salicílico em *Achillea millefolium* L. / Pedro Henrique Gorni. – Presidente Prudente, 2015.
50f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2015.

Bibliografia.

Orientadora: Ana Cláudia Pacheco Santos

1. Planta medicinal. 2. Regulador vegetal. 3.
Metabolismo secundário. I Título

Campus I Rua José Bongiovani, 700 · Cidade Universitária · CEP 19050 920 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 1000
Campus II Rodovia Raposo Tavares, Km 572 · Bairro Limoeiro · CEP 19067 175 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 2000

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: "PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E ATIVIDADE ELICITORA DO ÁCIDO SALICÍLICO EM *Achillea millefolium* L."

AUTOR: PEDRO HENRIQUE GORNI

ORIENTADORA: ANA CLAUDIA PACHECO SANTOS

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

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:



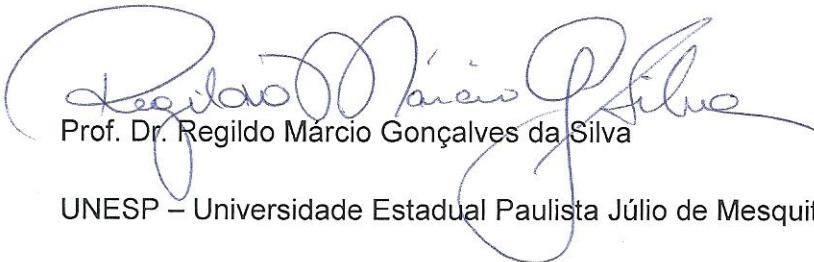
Profa. Dra. Ana Cláudia Pacheco Santos

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente-SP



Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente-SP



Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - / Assis-SP

Data da realização: 07 de Agosto de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pois sem Ele eu não teria forças para essa longa jornada.

Dedico a duas pessoas muito especiais que fizeram parte da minha vida: à Maria de Lurdes Galdi Viviani (in memoriam) e Marcos Galdi Viviani (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

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

A meus pais, que sempre primaram pela minha educação. Obrigado Sr. Claudio e Sra. Silvana, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre foram presentes e sou muito feliz por isso, lhes agradeço pela compreensão e ternura sempre manifestadas apesar da falta de atenção e ausências, pela excitação e orgulho com que sempre reagiram aos meus resultados acadêmicos ao longo dos anos. Eu amo vocês.

À Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pacheco Santos, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento do projeto, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao Prof Dr. Ricardo Alexandre Hakime Silva, pela competência científica e auxílio para realização das análises fitoquímicas, bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas.

À Prof^a Dr^a Elizabeth Mie Hashimoto, pelo inestimável apoio nas análises estatísticas.

Ao meu irmão, Guilherme e sua esposa Celiane, pela excelente amizade, e pelo maior presente que me deram um lindo sobrinho! Obrigado por acreditarem em mim.

Ao meu querido sobrinho que amo muito, Gabriel, a infância é uma etapa linda e abençoada onde tudo parece ser possível. Os heróis, os bandidos, as aventuras e as descobertas. Que Deus te proteja e te faça cada vez mais especial e cheio de graça. É um orgulho muito grande ter você como meu sobrinho.

Aos meus avós Eunice e Milton, Maria Helena e Pedro, por todo amor que me ofereceram.

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

À minha querida amiga de longa data Kelen, quero agradecer por me incentivar a seguir o caminho acadêmico e também por sempre estar ao meu lado. Agradeço também à sua linda família. Geison, Pedro Augusto e João Guilherme. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

Ao Guilherme Carboneze, que sempre me estimulou a crescer profissionalmente e pessoalmente. Acima de tudo, pelo inestimável apoio que preencheu as diversas falhas que fui tendo por força das circunstâncias, e pela paciência e compreensão reveladas ao longo destes anos.

À Engenheira Agrônoma Viviane Tavares e à Bióloga Alana Acorsi, pela amizade, apoio prestado e convivência diária, pelas proveitosas conversas e conselhos transmitidos.

À Engenheira Agrônoma Priscila Zanfolin, pela amizade ao longo destes anos, com quem partilhei alguns momentos da minha vida, pelo seu companheirismo, por compartilhar momentos inusitados de sua vida amorosa e por aceitar meus péssimos conselhos. Nunca se esqueça: "Sempre fui muito lindo, pois até as portas se abrem sozinhas para mim!", te adoro amiga.

Ao Engenheiro Agrônomo Rafael Gervazoni, por não medir esforços para as palhaçadas e risadas intermináveis, pois você soube ser amigo e parceiro.

Ao Engenheiro Agrônomo Leonardo Sobral, pela amizade durante esses anos e pelos momentos estressantes no laboratório para as realizações das análises fitoquímicas, pelas risadas, te desejo sucesso.

As amigades que conquistei durante esses 2 anos, muitos ficarão marcados por estes momentos. Obrigado por fazerem parte desta etapa da minha vida.

Aos alunos de graduação: Guilherme Batalini de Souza, Jean Lucas Gibertoni e Caroline Mattos, pela ajuda na etapa da colheita das plantas.

Aos funcionários da UNOESTE, pela forma carinhosa como fui recebido, pela disponibilidade manifestada e pelo incansável acompanhamento e apoio nas análises.

À CAPES, pela disponibilização de bolsa de estudo.

Ao Laboratório LIPEUL da UNOESTE pela possibilidade de utilização de equipamentos.

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

Mais uma vez, a todos os meus sinceros agradecimentos.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades! Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.
(Charles Chaplin)*

RESUMO

Promoção de crescimento e atividade elicitora do ácido salicílico em *Achillea millefolium* L.

O ácido salicílico (AS) é um composto fenólico presente em plantas e que possui múltiplas funções, dentre elas a ação hormonal de estímulo ao crescimento e desenvolvimento vegetal e a indução das respostas de defesa da planta sob condições de estresses bióticos e abióticos. Neste sentido, pesquisas relacionadas à ação elicitora do AS sobre a síntese de metabólitos secundários em plantas medicinais vem sendo conduzidas com a finalidade de se aumentar o valor econômico destas espécies. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da aplicação foliar de AS sobre a produção de biomassa e a síntese de compostos secundários em plantas de mil-folhas (*Achillea millefolium* L. – Asteraceae), uma espécie medicinal produzida comercialmente como matéria prima para a indústria mundial de fitomedicamentos. O experimento foi conduzido em plantas envasadas sob condições de casa de vegetação. A aplicação do AS foi efetuada nas concentrações de 0; 0,25; 0,50 e 1,00 mM aos 20 dias após o transplante das mudas para os vasos. O efeito do AS sobre o metabolismo das plantas de mil-folhas foi avaliado através de parâmetros biométricos de crescimento (área foliar, número de folhas, produção de biomassa aérea e radicular, razão raiz / parte aérea e razão área foliar / número de folhas) e parâmetros bioquímicos (teores de compostos fenólicos, óleo essencial, teores de pigmentos e capacidade antioxidante). A aplicação exógena de AS na concentração de 0,50 mM resultou em aumentos lineares no acúmulo de massa seca de raiz, massa seca total, razão raiz / parte aérea e teores de clorofila a e clorofila a+b em plantas de mil-folhas. A massa seca da parte aérea, área foliar, número de folhas e razão área foliar / número de folhas não foram alteradas pela aplicação de AS, bem como os teores de antocianinas, carotenóides e clorofila b. Os efeitos positivos sobre o metabolismo secundário foram evidenciados pelos aumentos na concentração de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante nas concentrações 0,50 e 1,00 mM. O teor e rendimento de óleo essencial foram maiores em plantas tratadas com 0,50 mM. Concluiu-se que a utilização de AS constitui-se em técnica de manejo vantajosa para a obtenção de aumento na massa seca total das plantas de mil-folhas, devido à maior massa seca de raízes. O efeito elicitor foi obtido com a aplicação de 0,50 mM de AS, resultando em maior valor econômico da matéria prima, devido ao aumento na produção de compostos secundários, tais como fenóis totais e óleo essencial, além de um concomitante aumento na atividade antioxidante do extrato vegetal.

Palavras-chave: Planta Medicinal, Regulador Vegetal, Óleo Essencial, Atividade Antioxidante.

ABSTRACT

Growth promotion and elicitor activity of salicylic acid in *Achillea millefolium* L.

Salicylic acid (SA) is a phenolic compound found in plants and has multiple functions, including hormone action of stimulating plant growth and development and induction of plant defense responses under conditions of biotic and abiotic stresses. In this sense, research related to SA elicitor action on the synthesis of secondary metabolites in medicinal plants has been conducted in order to increase the economic value of these species. The objective of this study was to determine the effect of foliar application of SA on biomass production and the synthesis of secondary compounds in yarrow (*Achillea millefolium* L. - Asteraceae), a medicinal species commercially produced as feedstock for the world of phytomedications industry. The experiment was conducted in potted plants under greenhouse conditions. The application of SA was made at concentrations of (0, 0.25, 0.50 and 1.00 mM) at 20 days after transplanting the seedlings to pots. The effect of SA on the metabolism of yarrow plants was evaluated through biometric parameters of growth (leaf area, leaf number, biomass production and root, root / shoot ratio and leaf area / number of sheets ratio) and biochemical parameters (levels of phenolic compounds, essential oil, pigment content and antioxidant capacity). Exogenous application of SA in the concentration of 0.50 mM resulted in linear increases in biomass accumulation of root, total dry mass, root / shoot ratio and chlorophyll a content and chlorophyll a + b in yarrow plants. The shoot dry mass, leaf area, leaf number and leaf area / number of sheets ratio were not changed by the application of SA and the anthocyanin content, carotenoids and chlorophyll b. The positive effects on the secondary metabolism were evidenced by increases in the concentration of phenolic compounds and antioxidant activity in 0.50 and 1.00 mM concentrations. The content and essential oil yield were higher in plants treated with 0,50 mM. It concludes that the use of SA is advantageous in management technique for obtaining increases in total dry mass of yarrow plants due to greater dry mass of roots. The elicitor effect was obtained with the application of 0.50 mM of SA, resulting in greater economic value of the feedstock due to increased production of secondary compounds, such as phenolic compounds and essential oils, and a concomitant increase in antioxidant activity the plant extract.

Keywords: Medicinal Plant, Growth Regulator, Essential Oil, Antioxidant Activity.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| FIGURA 1 - | Estrutura química do Ácido Salicílico..... | 16 |
| FIGURA 2 - | Fluxograma da obtenção do extrato alcoólico de folhas de <i>Achillea millefolium</i> L. por maceração..... | 23 |
| FIGURA 3 - | Massa seca parte aérea (A), massa seca raiz (B) e massa seca total (C) em plantas de <i>Achillea millefolium</i> L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0,00; 0,25; 0,50; 1,00mM). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey..... | 30 |
| FIGURA 4 - | Número de folhas e área foliar por planta de <i>Achillea millefolium</i> L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0,00; 0,25; 0,50; 1,00mM). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey..... | 32 |
| FIGURA 5 - | Razão raiz/parte aérea e razão área foliar/número de folhas em <i>Achillea millefolium</i> L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0,00; 0,25; 0,50; 1,00mM). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey..... | 34 |
| FIGURA 6 - | Teores de clorofila a (A), clorofila b (B) e clorofila total (a+b) (C) em <i>Achillea millefolium</i> L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0,00; 0,25; 0,50; 1,00mM). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey..... | 36 |
| FIGURA 7 - | Teores de antocianinas (A) e carotenóides (B) em <i>Achillea millefolium</i> L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0,00; 0,25; 0,50; 1,00mM). Letras iguais em cada coluna indicam ausência de diferença significativa pelo teste de Tukey.. | 38 |
| FIGURA 8 - | Teor e rendimento de óleo essencial em <i>Achillea millefolium</i> L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0,00; 0,25; 0,50; 1,00mM). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey..... | 40 |
| FIGURA 9 - | Teores de fenóis totais e atividade antioxidante em <i>Achillea millefolium</i> L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0,00; 0,25; 0,50; 1,00mM). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey..... | 42 |
| FIGURA 10- | Porcentagem da atividade antioxidante do extrato etanólico de <i>Achillea millefolium</i> L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0; 0,25; 0,50 e 1,00mM). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de ácido salicílico para cada concentração de extrato, pelo teste de Tukey..... | 44 |

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 | OBJETIVO..... | 14 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| 3.1 | Aspectos da cultura..... | 15 |
| 3.2 | Ácido Salicílico: efeitos sobre processos fisiológicos da planta..... | 16 |
| 3.3 | Ácido Salicílico: atuação como elicitador do metabolismo Secundário..... | 17 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 21 |
| 4.1 | Preparo do extrato alcoólico de <i>Achillea millefolium</i> | 22 |
| 4.2 | Análise Estatística..... | 27 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 28 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 44 |
| | REFERÊNCIAS..... | 45 |

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, desde que a matéria prima proveniente destas plantas será comercializada tanto em termos de quantidade como de qualidade.

Achillea millefolium L., comumente conhecida por mil-folhas, é utilizada na medicina popular contra várias doenças, incluindo inflamações da pele e distúrbios gastrointestinais e hepatobiliares. Além do uso tradicional, esta espécie é empregada como matéria prima nas indústrias de fitomedicamentos e de chás (BENEDEK; KOPP, 2007). No caso do Brasil, a Mil-folhas é uma das espécies listadas no Relatório Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Serviço Único de Saúde (RENISUS), cuja implantação e solidificação da cadeia produtiva vem sendo foco de políticas públicas e investimentos por parte do governo federal (BRASIL. Ministério da Saúde, 2009).

Elictores podem ser definidos como substâncias que, quando introduzidas em pequenas concentrações em um sistema de células vivas, iniciam ou aumentam a biossíntese de compostos específicos (RADMAN et al., 2003). O Ácido Salicílico (AS) é um composto fenólico relacionado às respostas de defesa do vegetal, o que explica a sua atuação como composto elicitador do metabolismo secundário tanto em espécies vegetais medicinais como espécies categorizadas como alimentos funcionais. Adicionalmente à sua ação elicitadora, o AS também atua positivamente sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, o que possibilitou a sua inclusão na lista de hormônios vegetais (KERBAUY, 2008).

Neste contexto, a aplicação de ácido salicílico pode melhorar o desempenho produtivo e a biossíntese de compostos secundários de interesse em plantas medicinais, constituindo-se em uma tecnologia com grande potencial de incorporação ao manejo técnico destas culturas. Para tanto, tornam-se necessários estudos sobre as dosagens aplicadas e respostas espécies-específicas, bem como investigações que auxiliem no entendimento do mecanismo de ação do composto citado.

O desenvolvimento abrangente de estudos fisiológicos que visam o aumento de produção através de aplicação de novas tecnologias em plantas medicinais torna possível o conhecimento das prováveis alterações em seu metabolismo, rendimento e qualidade da produção de princípios ativos. Desta forma, a possibilidade de manipulação das condições de cultivo se traduz em aumento no valor comercial destas espécies, alcançando maior competitividade no mercado.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da aplicação foliar de diferentes concentrações de AS sobre a produção de biomassa (efeito hormonal) e a síntese de compostos secundários (efeito elicitor) em plantas de mil-folhas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos da cultura

A espécie medicinal *Achillea millefolium* L. (mil-folhas), pertencente à família Asteraceae que é uma das maiores famílias 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, 180 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetacionais (BARROSO et al., 1991; NAKAJIMA; SEMIR, 2001). 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. Possui folhas compostas finamente pinadas, de 5 - 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. millefolium tem sido usada na medicina popular contra várias doenças, incluindo inflamações da pele e distúrbios espasmódicos gastrointestinais e hepatobiliares (BENEDEK; KOPP, 2007). Embora sendo espécie nativa de regiões temperadas, a Mil-folhas se adaptou bem às condições climáticas do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002).

Entre os compostos ativos da Mil-folhas destaca-se a presença de óleo essencial com terpenos (cineol, borneol, pinenos, cânfora, azuleno), derivados terpênicos e sesquiterpênicos, taninos, mucilagens, cumarinas, resinas, saponinas, esteroides, ácidos graxos, alcaloides e princípio amargo (CORRÊA; SIQUEIRA BATISTA; QUINTAS, 1998; PANIZZA, 1998; SIMÕES et al., 1998). Foram também detectados compostos do tipo lactonas e flavonóides (SIMÕES et al., 1998). Os flavonóides e seus heterosídeos estão relacionados com a atividade antiespasmódica (LEUNG, 1980). Cada parte da planta folhas, inflorescências e raízes é usada para uma ou mais finalidades diferentes (CHANDLER; HOOPER; HARVEY, 1982).

A *Achillea millefolium* L. é uma das espécies listadas no Registro Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Serviço Nacional de Saúde (RENISUS), sendo amplamente utilizada pela população brasileira. No entanto são necessários mais estudos para determinar as condições de crescimento e de

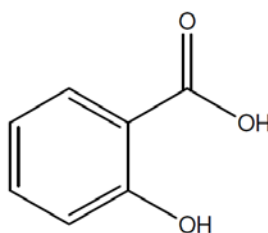
produção agrícola, segurança, eficácia e definições da forma farmacêutica mais adequada (BRASIL. Ministério da Saúde, 2009).

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. Adotando-se o espaçamento de 0,7 x 0,5 m 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 rentabilidade aproximada de produção de óleo essencial de Mil-folhas é de 23,36 Kg de óleo por hectare (NETTO; RAFAELLI, 2004).

3.2 Ácido Salicílico: efeitos sobre processos fisiológicos da planta

O ácido salicílico (AS) é um composto fenólico de natureza hormonal derivado do ácido benzóico e relacionado à aspirina. O AS é produzido pelas plantas e desempenha um papel importante na resposta a vários estresses abióticos e ao ataque de patógenos (NOREEN et al., 2009; HE et al., 2002).

FIGURA 1- Estrutura química do Ácido Salicílico.



Fonte: Taiz & Zeiger, 2004.

Na interação planta - patógeno, o AS é um conhecido indutor da resistência sistêmica adquirida (SAR), sendo acumulado rapidamente 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).

Além da atuação do AS como indutor das respostas de defesa do vegetal em condições de estresse, este atua também como um importante regulador

de diversos processos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Entre esses efeitos estão 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), regulação da síntese de clorofilas e carotenoides, fotossíntese, transpiração e condutância estomática (LIU et al., 2011), a reversão dos efeitos do ácido abscísico (DAVIES, 2004), a regulamentação do gravitropismo (HUSSEIN; BALBAA; GABALLAH, 2007), a inibição do amadurecimento de frutos (SRIVASTANA; DWIVEDI, 2000) e a tolerância a estresses bióticos e abióticos (POPOVA; PANCHEVA; UZUNOVA, 1997; HAYAT et al., 2005).

Hegazi e El –Shrayi (2007) testaram os efeitos da aplicação foliar de AS e paclobutrazol sobre o feijão. O AS, na dosagem de 0,01 mM aumentou consideravelmente o peso das plantas, atingindo os valores máximos de peso seco da parte aérea. Entretanto, esta dosagem resultou em diminuição nos conteúdos de clorofila a, clorofila b e clorofila total. Com relação ao florescimento, o AS na dose de 0,001 mM proporcionou um aumento no número de flores por planta e nos pesos fresco e seco das flores. A dose menor de AS (0,001 mM) favoreceu uma maior concentração de proteínas nas folhas do que nos nódulos, sendo observado um efeito contrário para a dose maior (0,01 mM).

Kazemi (2014) testou os efeitos da aplicação foliar de AS e ácido jasmônico (MJ) no crescimento, florescimento, rendimento e qualidade do fruto de tomate. Os resultados indicaram que o AS na dosagem de 0,5 mmol.L⁻¹ e MJ na dosagem de 0,25 mmol.L⁻¹, aplicados isoladamente ou em combinação (0,5 mmol.L⁻¹ de AS + 0,25 mmol.L⁻¹ MJ) aumentaram o crescimento vegetativo e reprodutivo, o rendimento e o teor de clorofila.

Askari e Ehsanzadeh (2015) caracterizaram as respostas fisiológicas de funcho (*Foeniculum vulgare*) ao déficit hídrico e à aplicação exógena de AS. Seis genótipos de funcho foram estudados, sendo submetidos a dois níveis de irrigação (irrigação após o esgotamento de 35 e 75% da água disponível no solo) e três níveis de AS (0,0; 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, carotenóides e óleo essencial, como também mudou significativamente as atividades de enzimas antioxidantes, características essas que em conjunto permitiram o funcho resistisse à seca.

3.3 Ácido Salicílico: atuação como elicitor do metabolismo secundário

Elicitação é um processo de síntese induzida ou melhorada de metabólitos secundários pelas plantas para garantir a sua sobrevivência, persistência e competitividade (NAMDEO, 2007). Elicitores podem ser definidos como substâncias que, quando introduzidas em pequenas concentrações em um sistema de células vivas, iniciam ou aumentam a biossíntese de compostos específicos (RADMAN et al., 2003). Conseqüentemente, a utilização de elicitores das respostas de defesa da planta tem sido avaliada como estratégia biotecnológica para aumentar a síntese de compostos secundários de planta de interesse para as indústrias de medicamentos e nutracêuticos (AL-TAWAHA et al., 2005). Dentre as moléculas citadas como elicitoras estão o metiljasmonato, o ácido salicílico, extratos de leveduras, a quitosana e os metais pesados (NAMDEO, 2007), os quais são geralmente aplicados em cultura de células, tecidos ou órgãos vegetais. 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.

O Ácido Salicílico (AS) é um composto fenólico relacionado às respostas de defesa do vegetal, o que explica a sua atuação como composto elicitor do metabolismo secundário, tanto em espécies vegetais medicinais como espécies categorizadas como alimentos funcionais. O AS induz a expressão de genes relacionados à produção de algumas classes de metabólitos secundários em plantas (TAGUCHI et al., 2001). Elicitores fúngicos também estimulam a acumulação de AS em algumas culturas de células de plantas, no entanto, a indução da maior parte dos metabólitos secundários por elicitores fúngicos é AS-independente. Isto pode sugerir que a acumulação de metabólitos secundários de plantas é uma resposta local, mas não sistêmica. O AS atua em plantas como elicitor biótico 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).

Zhang et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de três elicitores (ácido salicílico, acetato de etila e metil salicilato) aplicados via pulverização foliar em diferentes estádios fenológicos da soja sobre o teor de isoflavonas (compostos fenólicos pertencentes à classe dos flavonóides). Os resultados mostraram que as concentrações de 0,01 e 100 mM de AS aplicadas no

estádio R1 aumentam significativamente os níveis de algumas isoflavonas individuais em sementes de soja. Para todos os elicitores testados, a concentração utilizada foi mais decisiva do que a época de aplicação para a obtenção de aumento no teor de isoflavonas.

Pacheco et al. (2013) avaliaram a ação hormonal e elicitora da aplicação exógena de AS (0; 0,25; 0,50 e 1,0 mM) em plantas de calêndula (*Calendula officinalis* L.). Houve aumentos lineares no acúmulo de biomassa, número de inflorescências e teor de flavonóides nas plantas, sem entretanto ocorrerem alterações na atividade fotossintética e transpiração.

Kim et al. (2009) estudaram os efeitos da aplicação de AS, giberelina, citocinina e ethephon em dente-de-leão (*Taraxacum officinale*). Houve aumento significativo no conteúdo de flavonóides em resposta à aplicação de AS, mas o mesmo efeito não foi observado em relação aos demais reguladores. Tal comportamento foi observado apenas sob condições de estresse (WADA et al., 2010).

Kováčik et al. (2009) avaliaram a influência da aplicação de AS sobre aspectos fisiológicos e o metabolismo de fenóis em camomila (*Matricaria chamomilla*). As doses de AS testadas resultaram tanto em respostas de promoção (0,05 mM) como de inibição do crescimento (0,25 mM). Com relação ao metabolismo fenólico, a dosagem maior de AS resultou em efeito tóxico, indicado pelo aumento na atividade da enzima fenilalanina-amoníaco-liase (PAL), seguido pelo aumento na acumulação de compostos fenólicos solúveis e de lignina. Esta resposta geral pode ser explicada, segundo os autores, pelo mecanismo de indução de tolerância ao estresse oxidativo, como forma de mitigação ao estresse originado pela super dosagem de AS.

Pérez et al. (2014) avaliaram a aplicação foliar de AS (0,5; 1,0 e 2,0 mM) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (0,05; 0,1 e 0,5 mM) em plantas de *Mentha piperita* e o seu efeito sobre o perfil de metabólitos e da capacidade antioxidante de infusões resultantes. Os resultados demonstraram que a concentração 2 mM de AS aumentou os parâmetros de crescimento e perfil metabólico das plantas (carboidratos e aminoácidos), sendo que as concentrações 0,5 e 1 mM de AS aumentaram o teor de compostos fenólicos nas plantas de hortelã.

Rodrigues-Brandão et al. (2014) investigaram o efeito do AS sobre a atividade antioxidante e produção de betacianinas em folhas de *Alternanthera tenella*

cultivada *in vitro*. As plantas foram cultivadas em meio MS líquido e vermiculita como substrato. Após 35 dias, 15 mL de AS foi adicionado em uma concentração de 400µM. O conteúdo de betacianinas, fenóis totais e flavonóides e a capacidade antioxidante não-enzimática foram determinadas em folhas de *A. tenella* após 0, 12, 36 e 48h de tratamento. Os resultados obtidos demonstram que após 36h, as concentrações de betacianinas e fenóis totais aumentaram. Em contrapartida, o aumento no tempo de exposição causou uma ligeira diminuição nos teores de flavonóides totais e inibição da atividade do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Divya, Puthusseri e Neelware (2014) estudaram a aplicação de diferentes níveis de metil jasmonato e ácido salicílico na pré-colheita de plantas de coentro, a fim de aumentar a concentração de carotenóides totais, do betacaroteno luteína e, ao mesmo tempo, provocar o aumento de outros anti-oxidantes importantes, tais como compostos fenólicos, particularmente o ácido clorogênico (composto fenólico predominante em folhas de coentro). Os resultados demonstram que os teores de carotenóides e compostos fenólicos aumentaram 6,8 e 3% respectivamente, quando tratados com metiljasmonato (0,01 mM), enquanto que o tratamento com AS (0,5 mM) resultou em aumentos de 5,4 e 3,5% dos respectivos compostos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação com controle de temperatura e umidade, instalada na Área Experimental da Faculdade de Agronomia da UNOESTE, em Presidente Prudente/SP. As mudas foram obtidas a partir de plantas matrizes de mil-folhas (*Achillea millefolium* L.) provenientes do Horto de Plantas Medicinais da UNOESTE, cujas exsicatas estão depositadas no herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ - USP).

As mudas foram propagadas por divisão da touceira e plantadas em saquinhos com substratos para formação das mudas. Após o período de formação das mudas (30 dias), foi realizado o transplante das mesmas para vasos plásticos com capacidade para vinte litros, preenchidos com 18kg/vaso⁻¹ de solo de barranco. O solo foi corrigido seguindo resultado da análise química (Tabela 1), conforme recomendações para espécies herbáceas perenes do Boletim 100 – IAC. Adicionou-se calcário dolomítico 85% PRNT (31,86 g.vaso⁻¹), cloreto de potássio (2,7 g.vaso⁻¹), super fosfato simples (18 g.vaso⁻¹), para a adubação com micronutrientes adicionou-se 0,9 g.vaso⁻¹ do fertilizante FTEBR12[®] (granulado) (S: 3,9%, B: 1,8%, Mg: 2,0% e Zn: 9,0%).

Os vasos foram irrigados por aspersores duas vezes ao dia às 8 e 17 horas lâmina de 6,4mm à cada 12h, de modo a manter o solo úmido para garantir a disponibilidade hídrica necessária durante todo o ciclo da cultura.

TABELA 1- Análise química do solo utilizado no experimento.

| pH | M.O. | Ca | Mg | K | P | S | Mn | Fe | Cu | Zn | B |
|-------------------|--------------------|------------------------------------|-----|--------------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|
| CaCl ² | g dm ⁻³ | mmol _c dm ⁻³ | | -----mg dm ⁻³ ----- | | | | | | | |
| 4,3 | **** | 5,5 | 4,2 | 3,6 | 3,0 | 24,5 | 0,4 | 3,8 | 1,0 | 0,5 | 0,14 |

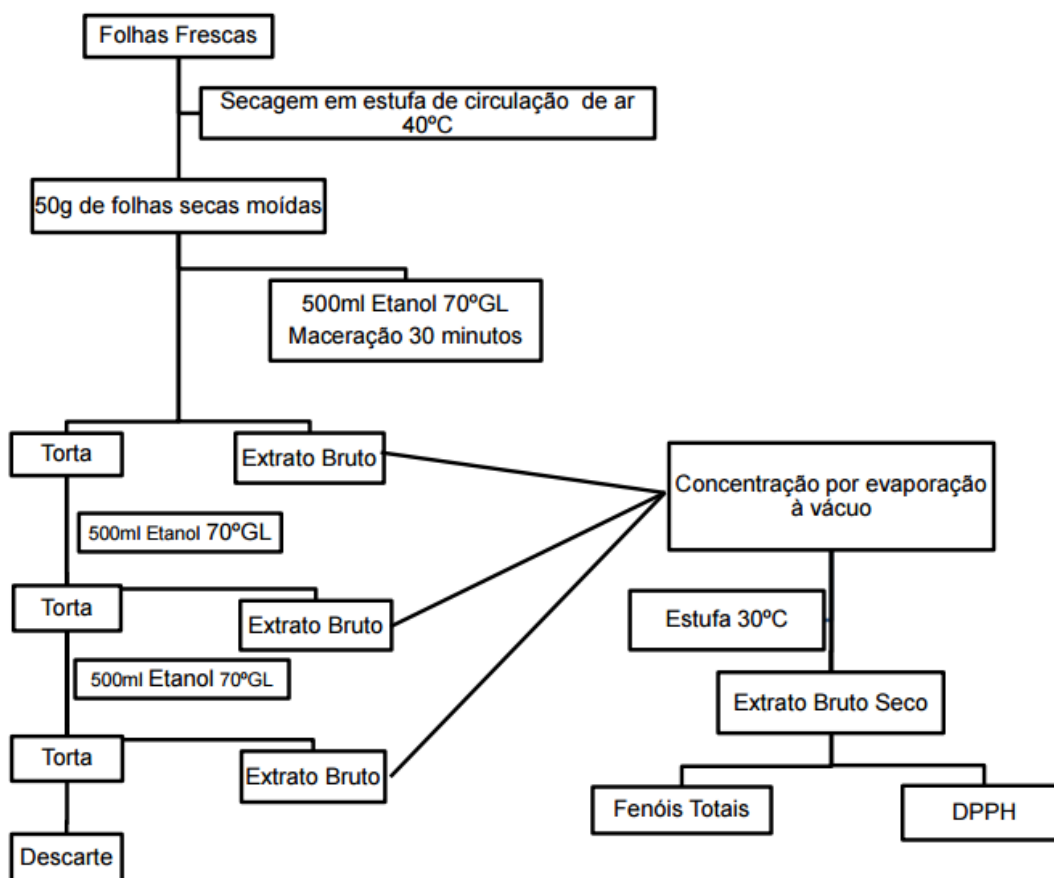
A aplicação do Ácido Salicílico (AS) foi realizada aos 20 dias após o transplante das mudas para os vasos, durante 3 dias consecutivos. As diferentes concentrações de AS utilizadas (0; 0,25; 0,50 e 1,00mM) foram preparadas a partir de uma solução mestra de 1,00mM. Optou-se por não usar a concentração 0,75 mM de AS com base em análise de resultados para essa concentração na literatura (PACHECO et al., 2013; ASKARI; EHSANZADEH, 2015). O produto, na formulação

pó (Sigma Aldrich, PM 138,1 g), foi pesado em balança analítica, diluído em 10 ml de etanol 90° e finalmente dissolvido para 1 L de água destilada. A pulverização foi realizada em toda a parte aérea das plantas até o ponto de gotejamento, aplicando-se 40 mL/plantas, através de pulverizador manual com capacidade para 2 litros; utilizando-se o Agral[®] (nonil fenoxi poli (etilenoxi) etanol) como agente espalhante adesivo na proporção de 50 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de solução.

4.1 Preparo do extrato alcoólico de *Achillea millefolium* L.

As determinações do teor de compostos fenólicos totais e teor de antioxidantes totais não enzimáticos foram realizadas a partir da obtenção de extrato etanólico. As folhas de *A. millefolium* L. foram secas em estufa a 40°C e trituradas em liquidificador. Uma massa de 50g de folhas secas e trituradas foram submetidas à extração com 1,5L de solvente extrator 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 mesma 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 seco após secagem em estufa de circulação de ar à 30°C (COSTA, 2002; SIMÕES et al., 2007), conforme fluxograma apresentado na Figura 2.

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



A colheita foi realizada aos 120 dias após o transplante das mudas para os vasos, colhendo-se folhas jovens e adultas. O efeito do AS nas plantas foi avaliado pelas seguintes variáveis:

a) Área foliar planta⁻¹ (AF) (cm²):

Avaliada por método destrutivo, utilizando medidor portátil de área (modelo LI - 3000A, LI-COR, USA). Foram avaliadas 5 plantas/repetições por tratamento.

b) Número de folhas/planta (NF):

O número de folhas foi determinado por contagem manual, sendo consideradas as folhas uniformes.

c) Massas seca parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) em 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 seu peso constante em 36 horas e 60°C (raízes) obtendo seu peso constante em 72 horas, para a determinação da massa de matéria seca.

d) Razão raiz/parte aérea (R/PA):

Foi realizada uma análise de partição de biomassa pela relação entre a massa seca da raiz e massa seca da parte aérea (BENINCASA, 2003).

e) Razão de área foliar/número de folhas (AF/NF):

Foi realizada uma análise de partição de biomassa pela relação entre a área foliar e o número de folhas por planta (BENINCASA, 2003).

f) Teor de pigmentos foliares (clorofila a, clorofila b, carotenóides e antocianinas):

A extração de pigmentos de acordo com o método de Sims e Gamon, (2002). Foram pesadas 0,047 g de folhas e maceradas em nitrogênio líquido. Acrescentou-se 3 mL de solução tamponada (80% de acetona pura e 20% da solução TRIS[®] - (hidroximetil) aminometano, molaridade 121,14 g.mol⁻¹), colocando-se em freezer por 1 hora para a liberação dos pigmentos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas à 4°C por 5 minutos a 200 rpm. Depois deste processo, foram retirados os sobrenadantes e colocados em cubetas para leitura realizada em espectrofotômetro (clorofila "A" a 663nm; clorofila "B" a 647nm; antocianinas a 537nm e carotenóides a 470nm).

Os valores foram submetidos aos cálculos:

$$\text{Clorofila } a = 0,01373 \times (A663) - 0,000897 \times (A537) - 0,003046 \times (A647)$$

$$\text{Clorofila } b = 0,02405 \times (A647) - 0,004305 \times (A537) - 0,005507 \times (A663)$$

$$\text{Clorofila } a + b = \text{Cla} + \text{Clb}$$

$$\text{Antocianinas} = 0,08173 \times (A537) - 0,00697 \times (A647) - 0,002228 \times (A663)$$

$$\text{Carotenóides} = \frac{(A470 - (17,1 \times (\text{Cla} + \text{Clb}) - 9,479 \times (\text{antocianinas}))}{119,26}$$

g) Teor de fenóis totais nas folhas ($\mu\text{g/ml}$):

A concentração de fenóis totais (FT) dos extratos foi analisada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI JR, 1965) com modificações. O procedimento foi realizado em tubos de ensaio com capacidade de 3 mL. Um volume de 300 μL da solução teste diluído em água destilada na proporção 1:10 foi misturado com 1500 μL do reagente Folin-Ciocalteu também diluído em água destilada (5 mL de Folin + 45 mL de água destilada). Após 5 minutos, adicionou-se à mistura 1200 μL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v) e os tubos de ensaio foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos. Decorrido o tempo, a absorbância foi determinada a 735 nm, utilizando espectrofotômetro.

O teor de fenóis totais ($\mu\text{g/mL}$) 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 5 a 70 $\mu\text{g/mL}$ diluído em etanol 98° GL. As concentrações de fenóis foram expressas em $\mu\text{g/mL}$ de equivalentes de ácido gálico.

h) Teor de antioxidantes totais nas folhas:

Para este ensaio, utilizou-se o extrato bruto seco diluído na proporção de 1:2 em etanol. À solução, adicionou-se 0; 20; 40; 60 e 100 μL da amostra, acrescentou-se 250 μL de solução de DPPH e o volume foi completado com etanol 98° para 3000 μL . A leitura a 517 nm foi realizada em espectrofotômetro (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

A partir dos resultados obtidos, determinou-se a concentração inibitória (IC). A quantidade de antioxidantes necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração inibitória 50% (IC₅₀). A porcentagem de supressão do radical DPPH foi obtida pela seguinte equação:

$$C1 . V1 = C2 . V2$$

Onde: C1 é o valor da diluição realizada e V1 é o valor da concentração da amostra, C2 é a concentração final e V2 é o volume final (amostra + DPPH + etanol).

Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram também convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA), determinada pela equação:

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

Onde: $A_{controle}$ é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH e $A_{amostra}$ é a absorbância da mistura reacional (DPPH+amostra) (MOREIRA et al., 2005; YEN; DUH, 1994).

i) Teor (TOE) e Rendimento de óleo essencial (ROE) nas folhas:

Para verificação destes parâmetros foram utilizados 4 plantas de cada tratamento, nas quais as folhas foram retiradas e colocadas em sacos de papel Kraft, acondicionando-se em estufa de circulação forçada de ar a 35°C. O método de extração adotado foi a hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado por Wasicky e Akisue (1969). Uma amostra de 10 g de folhas secas não trituradas por planta foi colocada em balão volumétrico de 1000 mL e acrescentado um volume 500 mL de água destilada em um período de extração de 90 minutos. Ao final do período de extração, o hidrolato obtido de cada hidrodestilação foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação, com 3 porções de 25 mL de diclorometano (cada porção descansou por 20 minutos, totalizando 60 minutos por repetição). As frações orgânicas de cada repetição foram reunidas e secas com uma porção em excesso de sulfato de magnésio anidro. O sal foi removido por filtração simples e os solventes foram evaporados em capela de exaustão de gases até

alcançar o peso constante, obtendo-se o óleo essencial purificado. Diante da massa obtida, foi determinado o teor percentual de óleo essencial nas folhas: $T\% = \text{massa do óleo (g)} / 10 \text{ g} \times 100$. O rendimento foi calculado pela fórmula: $R = \text{massa seca total de folhas por planta (g)} \times \text{massa seca do óleo obtido (g)} / 10 \text{ g}$, de acordo com Brant et al. (2009).

4.2 Análise estatística

O experimento foi realizado em arranjo inteiramente casualizado, com 4 tratamentos (concentrações de AS) e 10 repetições (indivíduos) em cada tratamento. Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$), e, posteriormente ao teste Tukey e análise de regressão. A escolha do modelo de regressão escolheu-se curvas com menor índice e maior R^2 , para expressar o comportamento das variáveis em função do aumento das doses de AS. Realizou-se análise de regressão para as variáveis com teste F significativo e não significativo, como indicado por Pimentel Gomes (2009). Os resultados são apresentados pela média dos tratamentos e erro padrão. Utilizou-se o Programa Estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise de variância é apresentado na Tabela 2. Apenas as variáveis razão área foliar / número de folhas, teor de clorofila b, carotenóides e antocianinas não apresentaram resposta significativa para os tratamentos com AS.

TABELA 2 - Quadro de análise de variância das variáveis: área foliar (AF), número de folhas (NF), massa seca parte aérea (MSPA), massa seca raiz (MSR), massa seca total (MST), razão raiz - parte aérea (R/PA), razão área foliar - número de folhas (AF/NF), clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b), clorofila total (Cl a+b), carotenóides (Carot.), antocianinas (Ant.), Fenóis Totais (FT), teor de antioxidantes totais não enzimáticos (DPPH), teor de óleo essencial (TOE) e rendimento de óleo essencial (ROE).

| Variáveis | S.Q. | Q.M | F |
|-----------|-------------|------------|-------------|
| AF | 847283,5949 | 282427,865 | 6,2994 ** |
| NF | 659,625 | 219,875 | 3,8934 * |
| MSPA | 51,36387 | 17,12129 | 1,7811* |
| MSR | 0,57877 | 0,19292 | 14,77 ** |
| MST | 0,39857 | 0,13286 | 13,494** |
| R/PA | 117,3707 | 39,1236 | 14,2591 ** |
| AF/NF | 1.555,5457 | 518,4856 | 1,4746 ns |
| Cl a | 0,1157 | 0,03857 | 6,7894 ** |
| Cl b | 0,02863 | 0,00954 | 1,6699 ns |
| Cl a+b | 0,25481 | 0,08494 | 3,9017 * |
| Carot. | 0,18938 | 0,06313 | 0,2913 ns |
| Ant. | 2,18949 | 0,72983 | 1,6442 ns |
| FT | 656,70519 | 218,90173 | 4,0958 * |
| DPPH | 178,596 | 59,532 | 109,3333 ** |
| TOE | 0,18698 | 0,06233 | 4,1646 * |
| ROE | 0,0335 | 0,01117 | 5,4411 * |

** Significativo a 1% de probabilidade ($p \leq 0,01$)

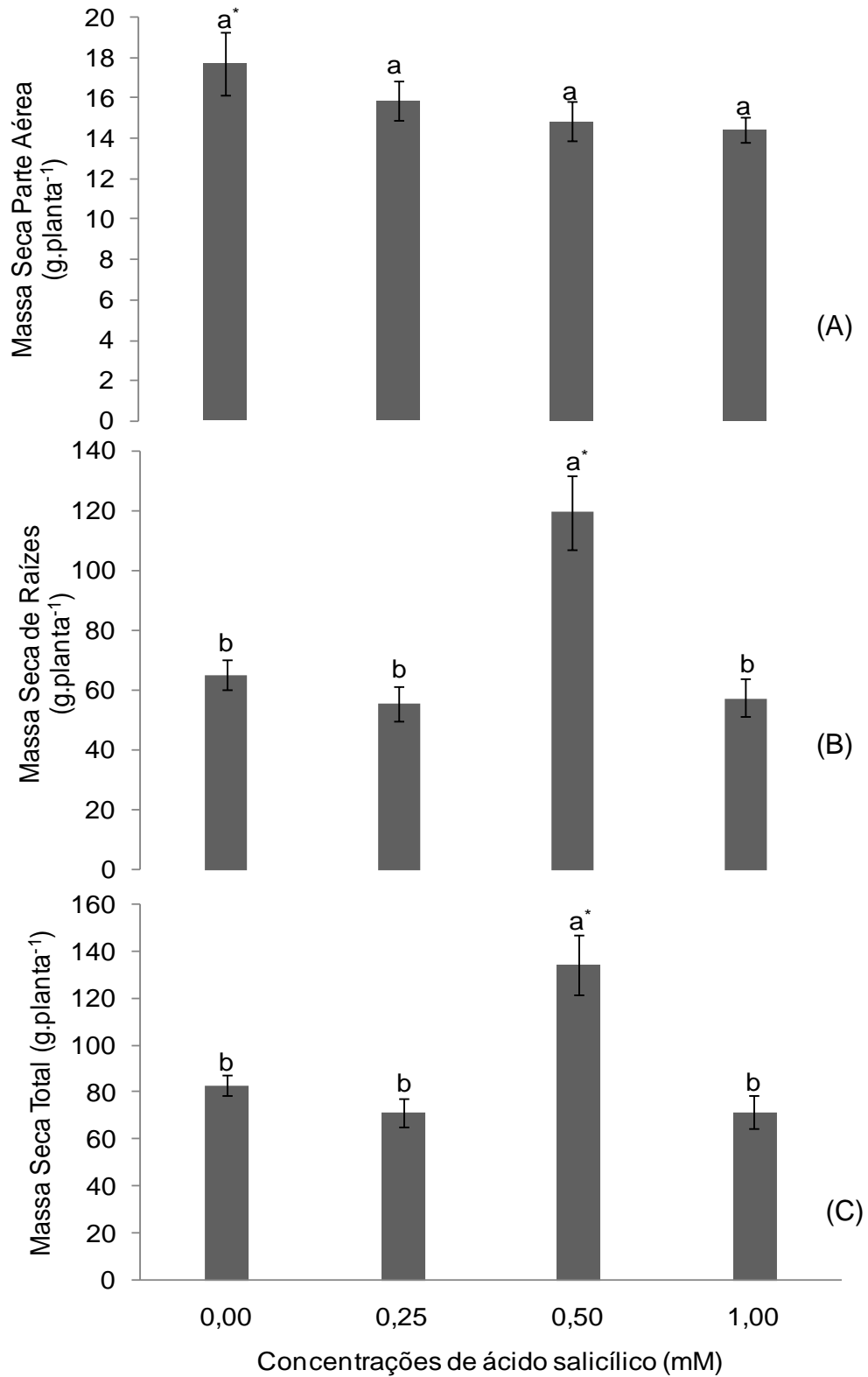
* Significativo a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

ns - não significativo

A massa seca da parte aérea (Figura 3 A) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, houve um aumento significativo de 83,11% na massa seca de raízes (Figura 3 B), colaborando para que a massa seca

total das plantas fosse 61,93% maior em relação às plantas controle na concentração de 0,50 mM de AS (Figura 3 C). Plantas com maior massa de raízes podem ser beneficiadas pelo aumento na absorção de água e nutrientes, o que em última análise se reverte em melhora geral dos processos fisiológicos do vegetal. Parashar et al. (2014), avaliando plantas de *Brassica juncea* tratadas com 0,01 mM de AS, os quais relataram aumentos na massa seca da raiz (26%) e parte aérea (51%), ocorrendo porém uma redução na área foliar.

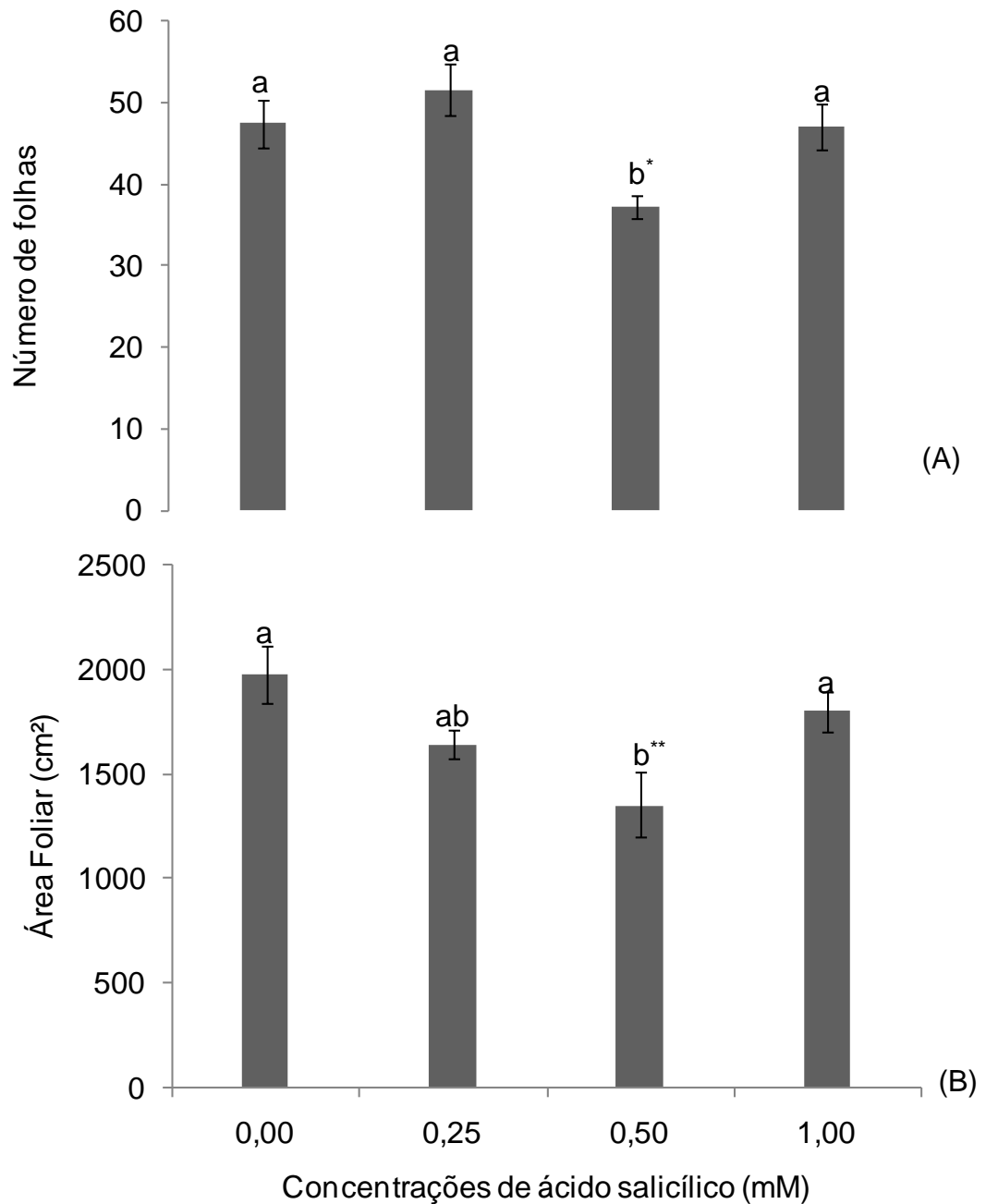
FIGURA 3 - Massa seca parte aérea (A), massa seca raiz (B) e massa seca total (C) em plantas de *Achillea millefolium* L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0; 0,25; 0,50 e 1,00mM). Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey * ($p \leq 0,05$).



O número de folhas em plantas de *A. millefolium* tratadas com 0,25 e 1,00 mM de AS não diferiu significativamente das plantas controle (Figura 4 A), ocorrendo diminuição significativa de 28% desta variável para a concentração de 0,50 mM. Resultados diferentes foram encontrados em plantas de calêndula, onde foram obtidos aumentos no número de folhas por planta, massa seca de folhas e área foliar em decorrência do tratamento com 1,00 mM de AS (PACHECO et al., 2013).

Houve redução significativa de 46,2% da área foliar na concentração 0,50 mM de AS em relação às plantas controle (Figura 4 B). Resultados diferentes deste foram obtidos por Esmielli, Heidarzade e Zeinali (2015), onde o tratamentos de plantas de arroz com 0; 1 e 2% de AS resultou em aumento de 14% no parâmetro área foliar para a concentração de 2% de AS.

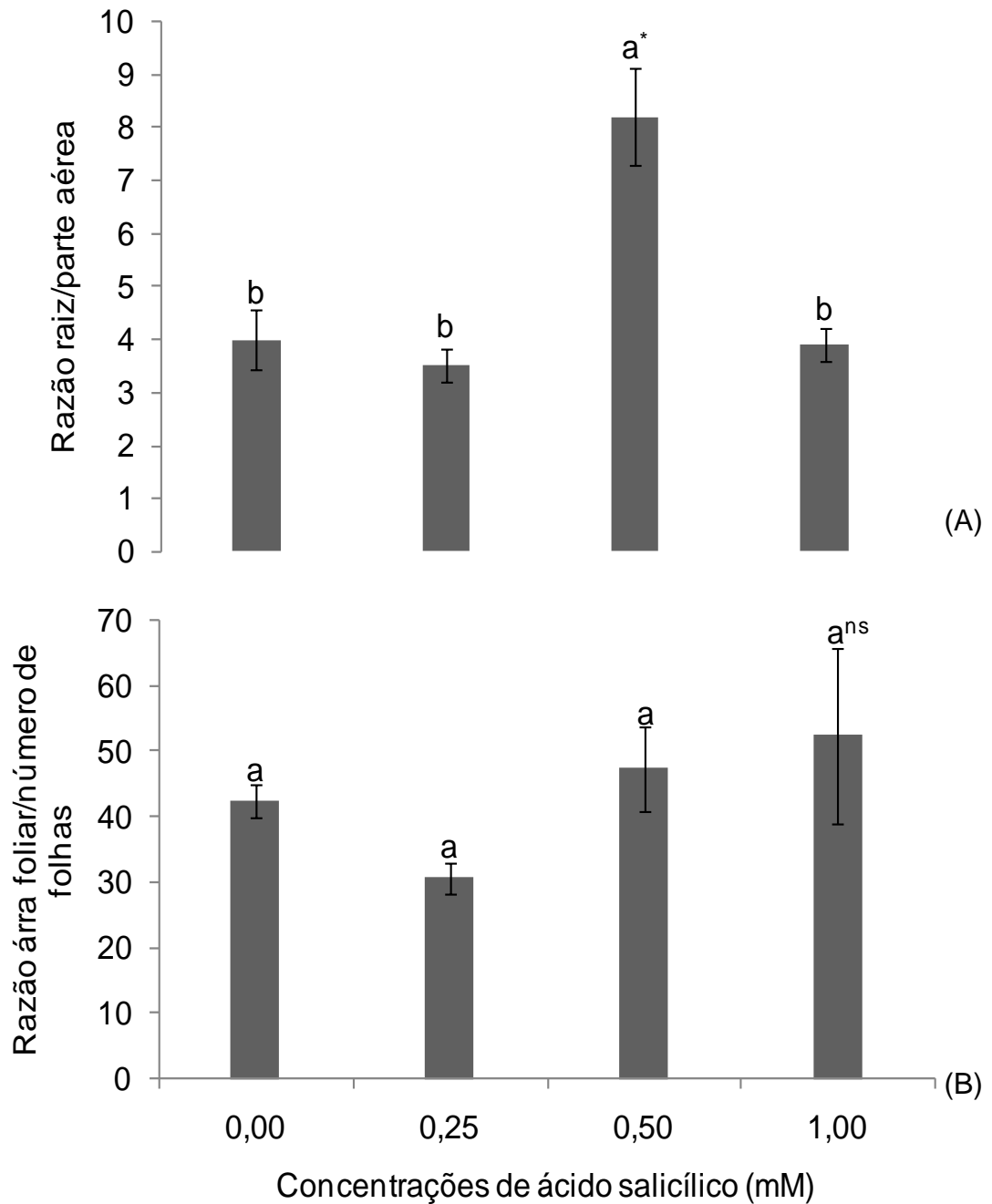
FIGURA 4 - Número de folhas e área foliar em plantas de *Achillea millefolium* L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0; 0,25; 0,50 e 1,00mM). Letras distintas indicam diferença significativa ao teste de Tukey * ($p \leq 0,05$) ** ($p \leq 0,01$).



Houve um aumento no parâmetro razão raiz / parte aérea para a concentração 0,50 mM de AS (Figura 5 A). A razão de raiz / parte aérea parece ser controlada por um balanço funcional entre a absorção de água pelas raízes e a fotossíntese pela parte aérea das plantas. 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. Este balanço funcional é alterado se o suprimento hídrico decrescer (BLUM, 2005) ou pela aplicação de reguladores vegetais, como ocorreu neste experimento. Entretanto, o maior parcelamento de carboidratos para as raízes em detrimento das folhas como resposta ao AS não se repetiu na maior concentração aplicada (1,0mM de AS). Resultados diferentes foram encontrados em plantas de milho, tratadas com 0,20 e 40 mgL⁻¹ de AS, as quais apresentaram razão raiz / parte aérea menor do que as plantas não tratadas (AHMAD; BASRA; WAHID, 2014). Estes resultados comparados com outros encontrados na literatura, mostram que o AS tem uma resposta espécie-específica e concentração-dependente, pois são revelados diferentes efeitos entre outras espécies (DIVYA; PUTHUSSERI; NEELWARNE, 2015; PÉREZ et al., 2014).

A razão entre área foliar / número de folhas de plantas tratadas com AS (Figura 5 B), não apresentou resultado significativo para as concentrações de AS.

FIGURA 5 - Razão raiz/parte aérea e razão área foliar/número de folhas em *Achillea millefolium* L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0; 0,25; 0,50 e 1,00mM). Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey * ($p \leq 0,05$) ^{ns} (não significativo).



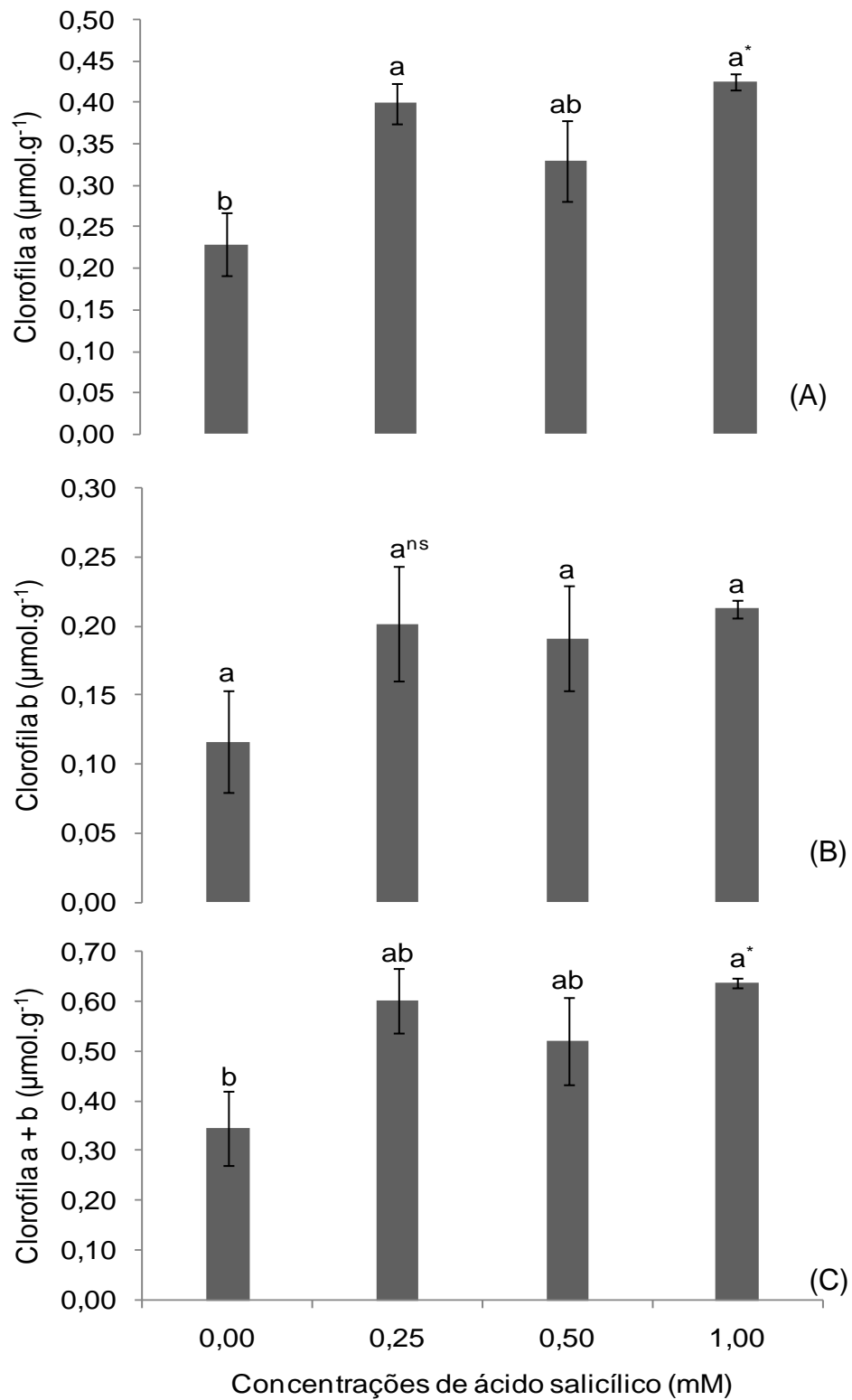
O teor de clorofila é um importante índice fisiológico diretamente relacionada com a performance fotossintética das plantas (ASKARI; EHSANZADEH, 2015). O teor de *cl a* (Figura 6 A) observada nas plantas tratadas nas concentrações de 0,25 e 1,00 mM de AS, aumentou significativamente em 74,46 e 85,77%, respectivamente, em relação ao teor apresentado pelas plantas controle.

Em relação ao teor de *cl b* (Figura 6 B), não houve diferença significativa entre as concentrações de AS. Resultados de aumentos na clorofila a em 2,8 e clorofila b em 1,8 vezes foram observados por Divya, Puthusseri e Neelwarne (2014) para o tratamento foliar com AS em *Coriandrum sativum* L. na concentração de 0,50 mM; após três dias da aplicação.

O teor *cl a+b* (Figura 6 C) aumentou significativamente em 84,83% na concentração de 1,00 mM de AS comparado ao das plantas controle. Askari e Ehsanzadeh (2015) observaram um aumento do teor de clorofila total (a + b) nas concentrações 0,50 e 1,00 mM de AS em plantas de *Foeniculum vulgare* Mill.

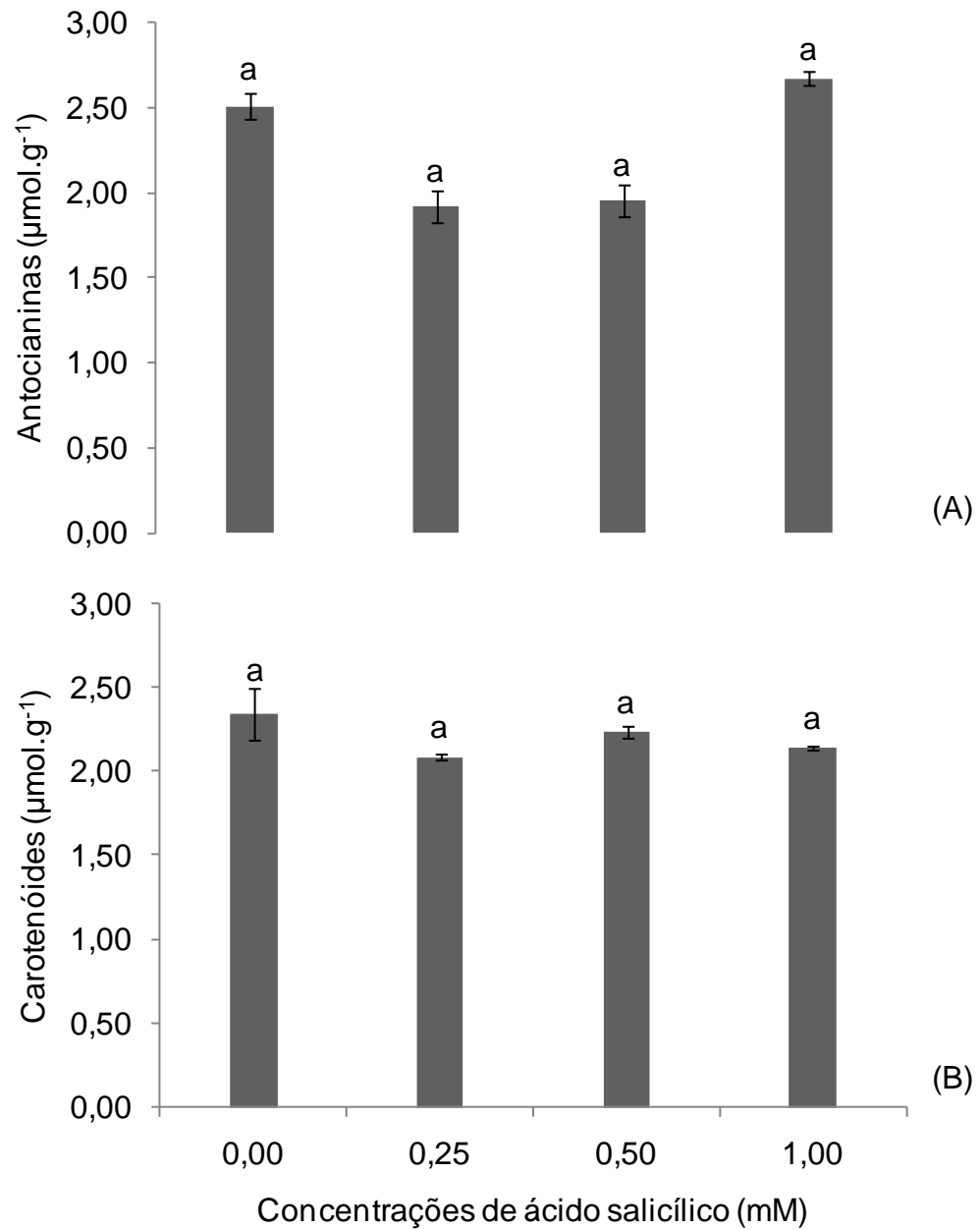
O tipo de efeito que o AS exerceu nas plantas fornece uma boa indicação de que essa substância estimula a síntese de clorofilas e, como resultado, observam-se incrementos na fotossíntese, na reserva de carboidratos, na divisão celular e na superfície da folha (ABDOLLAHI; JAFARPOUR; ZEINALI, 2011).

FIGURA 6 - Teores de clorofila a (A), clorofila b (B) e clorofila total (a+b) (C) em *Achillea millefolium* L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0; 0,25; 0,50 e 1,00mM). Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey * ($p \leq 0,05$) ** ($p \leq 0,01$) ^{ns} (não significativo).



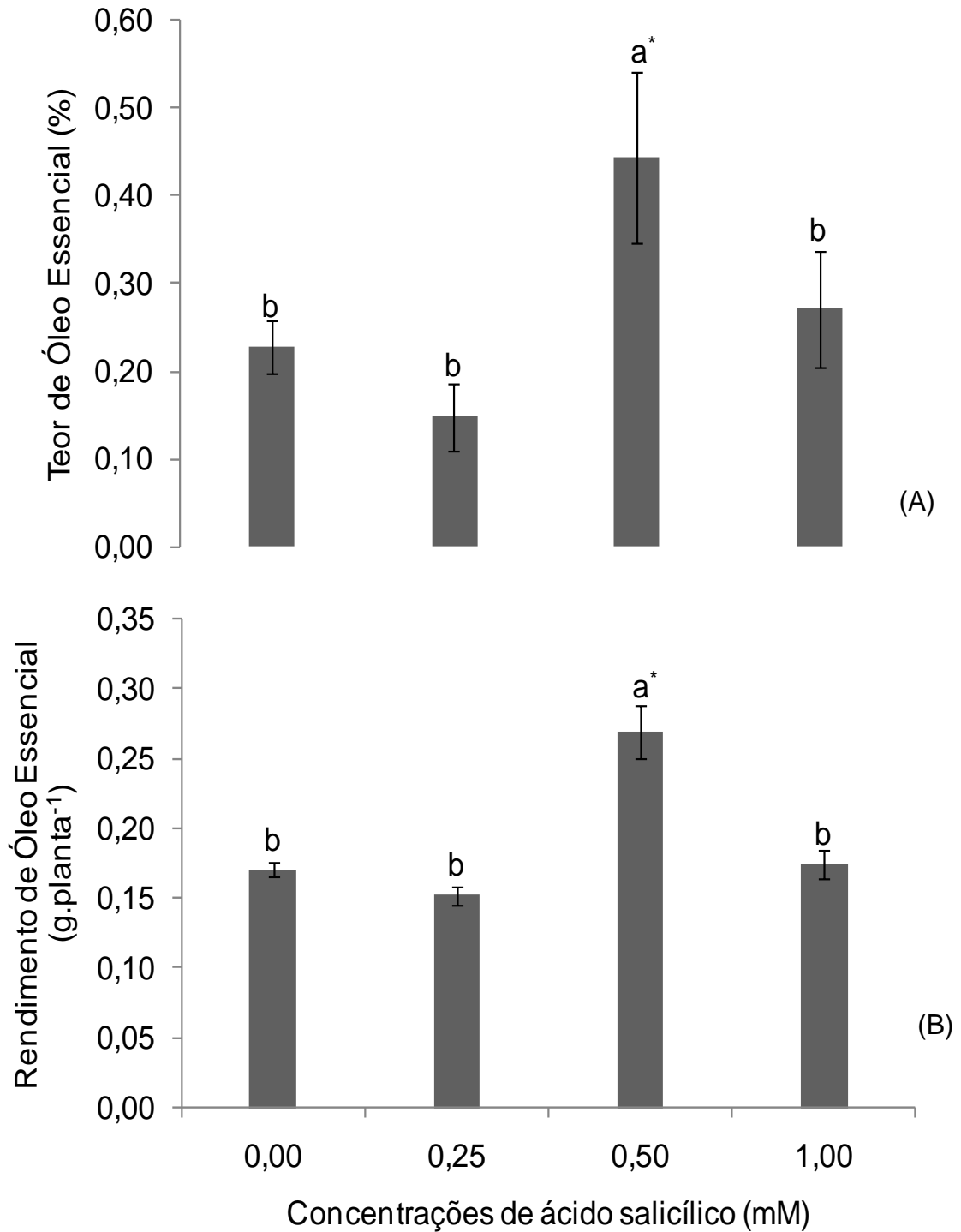
Os teores de antocianinas e carotenóides (Figuras 7 A e B) não apresentaram valores com diferença significativa entre os tratamentos. Baenas et al. (2015) aplicaram ácido jasmônico (AJ) (0,15 mM), jasmonato de metilo (MeJa) (0,025 mM), ácido salicílico (AS) (0,01 mM), glicose oligossacáridos (277 mM) e sacarose (176 mM) em rabanetes cv. China e Rambo, observaram um aumento no teor de antocianinas em 21% e 7% respectivamente na concentração de 0,1 mM AS. A pulverização foliar em *Coriandrum sativum* L. com AS na concentração de 0,50 mM resultou em um aumento de 5,4 vezes no teor de carotenóides totais após três dias de aplicação. Dado que o ácido salicílico é conhecido por afetar a velocidade de fotossíntese em plantas, o seu efeito direto no aumento de carotenóides pode ser esperado uma vez que os carotenóides são necessários para extinguir várias espécies reativas de oxigênio formadas continuamente durante a foto-oxidação (DIVYA; PUTHUSSERI; NEELWARNE, 2014).

FIGURA 7 - Teores de antocianinas (A) e carotenóides (B) em *Achillea millefolium* L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0; 0,25; 0,50 e 1,00mM). Letras iguais em cada coluna indicam ausência de diferença significativa pelo teste de Tukey.



O teor e rendimento do óleo essencial são apresentadas na Figura 8 (A - B), onde a concentração de 0,50 mM de AS resultou em aumento significativo de 94,86 e 58,24% respectivamente destas variáveis, em relação às plantas controle. Resultados obtidos por Nourafcan et al. (2014), aplicaram 2,5; 5; 10 e 20 mM de AS em plantas de *Lippia citriodora*, indicando que o maior rendimento do óleo essencial foi encontrado na concentração 10 mM de AS (0,71%), sendo que a aplicação exógena de AS, especialmente nesta concentração, melhorou a qualidade e quantidade do óleo essencial. Silva et al. (2014), avaliaram o efeito do AS na composição do óleo essencial de *Melissa officinalis* cultivada *in vitro*, demonstrando que as proporções máximas de geranial/geraniol e neral/nerol apresentaram um aumento de 2,2 e 1,6 vezes, respectivamente, após 24 horas de exposição ao AS. O AS atua em plantas como elicitador biótico 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).

FIGURA 8 - Teor e rendimento de óleo essencial em *Achillea millefolium* L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0; 0,25; 0,50 e 1,00mM). Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey * ($p \leq 0,05$).



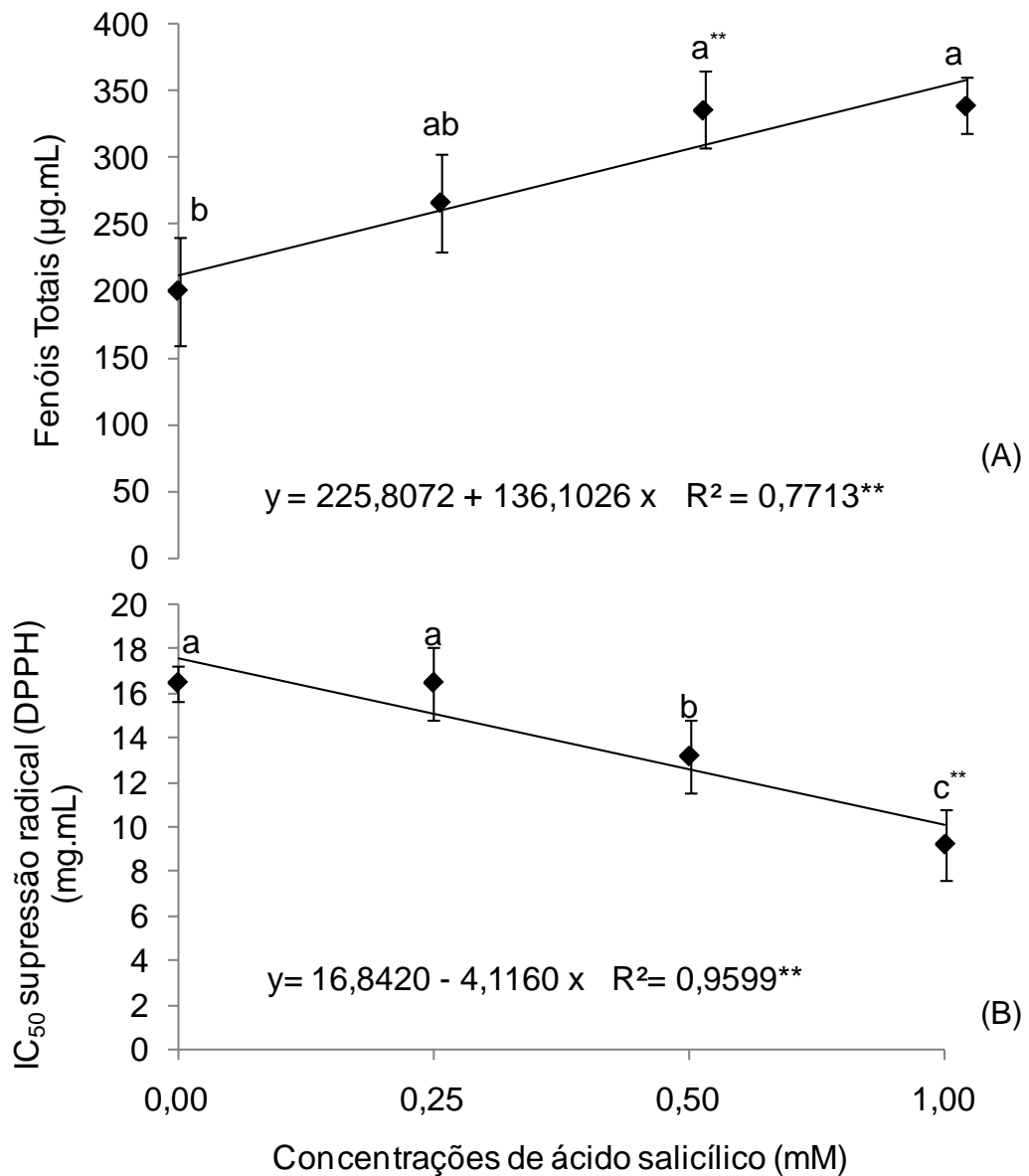
A aplicação exógena de AS apresentou efeitos significativos sobre a acumulação de fenóis totais em mil-folhas, como mostrado pela relação linear positiva entre o teor de fenóis totais e as concentrações de AS aplicadas (Figura 9 A). As plantas tratadas com 0,50 e 1,00 mM de AS apresentaram aumento de 68,11 e 69,74% respectivamente, nos fenóis totais em relação às plantas controle. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Pérez et al. (2014) em plantas de hortelã tratadas com AS, as quais apresentaram um aumento no conteúdo fenólico total de 65%, 35% e 31% para as concentrações de 0,50; 1,00 e 2,00 mM respectivamente.

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 com os metabolitos primários, tais como proteínas, lipídios e hidratos de carbono; capazes de retardar ou evitar a oxidação dos substratos (ARUOMA, 1999). Compostos fenólicos ou polifenóis podem atuar como antioxidantes por remoção do oxigênio singlete e outros radicais livres nas células (RICE-EVANS et al., 1995). As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos são principalmente devido à sua capacidade de doar hidrogênio de grupos hidroxila posicionados ao longo do anel aromático, de modo a evitar a oxidação por radicais livres de lipídios e outras biomoléculas (FOTI et al., 1994).

A atividade antioxidante do extrato de *A. millefolium* foi analisada de acordo com os valores de IC_{50} (Figura 9 B), em que valores mais baixos indicam alta atividade antioxidante. As concentrações de 0,50 e 1,00 mM de AS resultaram em uma redução significativa nos valores de IC_{50} em 25 e 79% em relação ao IC_{50} das plantas controle. Resultados semelhantes foram obtidos em plantas de hortelã (*Mentha piperita*) tratadas com AS (PÉREZ et al., 2014), onde as concentrações de 0,50 e 1,00 mM de AS produziram reduções significativas nos valores de IC_{50} (88% e 78% em relação à IC_{50} das plantas controle, respectivamente). Segundo estes autores, estes efeitos podem ser atribuídos ao aumento de compostos fenólicos em plantas tratadas com AS. 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 carboidratos (BOHNERT; JENSEN, 1996), betacianinas

(RODRIGUES BRANDÃO et al., 2014) e terpenos como carotenoides e tocoferol (JANDA et al., 2014).

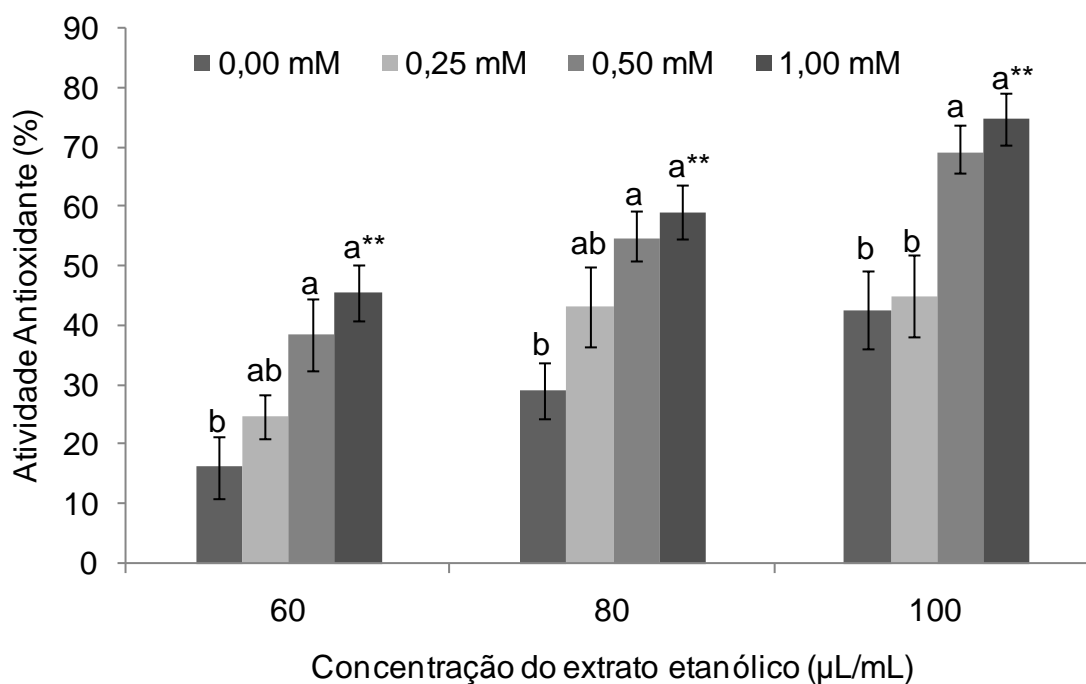
FIGURA 9 - Teores de fenóis totais e atividade antioxidante em *Achillea millefolium* L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0; 0,25; 0,50 e 1,00mM). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ** ($p \leq 0,01$).



Aumentos na síntese de diferentes compostos fenólicos em resposta à aplicação de elicitores, principalmente AS, pode ser o resultado da indução de um estado de estresse oxidativo nas plantas (PÉREZ et al., 2014); desde que o AS exógeno, mesmo em baixas concentrações, interage com mecanismos sinalizadores de estresse. Dessa forma, o uso de elicitores, as concentrações aplicadas e a duração do tratamento devem ser cuidadosamente considerados a fim de evitar efeitos prejudiciais. Ainda, elicitores bióticos e abióticos podem ter efeitos diferentes sobre uma mesma espécie de planta, devendo-se considerar também o tipo de elicitor a ser utilizado (RODRIGUES BRANDÃO et al., 2014).

Os resultados expressos na Figura 10 permitem verificar que em todas as quantidades de amostras do extrato etanólico das folhas houve diferença significativa entre as porcentagens de atividade antioxidante nas diferentes concentrações de AS. Entretanto, as plantas tratadas com as concentrações de 0,50 e 1,00 mM de AS apresentaram maior %AA para as mesmas quantidades de extratos, quando comparadas com as plantas controles.

FIGURA 10 - Porcentagem da atividade antioxidante do extrato etanólico de *Achillea millefolium* L., sob diferentes concentrações de ácido salicílico (0; 0,25; 0,50 e 1,00mM). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de ácido salicílico para cada concentração de extrato, pelo teste de Tukey $^{**}(p \leq 0,01)$.



Sugere-se que aumentos nos teores endógenos de AS podem desencadear a sinalização celular que regula a expressão de genes codificadores de enzimas relacionadas com a via de produção dos fenilpropanóides. O aumento na atividade de enzimas chave desta via metabólica, como a fenilalanina amônia-liase e a chalcona sintase, são mencionados como resultado da aplicação de AS (GHASEMZADEH; JAAFAR; KARIMI, 2012 ; RUIZ-GARCÍA ; GÓMEZ- PLAZA, 2013).

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a utilização de AS constitui-se em técnica de manejo vantajosa para a obtenção de aumento na massa seca total das plantas de mil-folhas, devido à maior massa seca de raízes. O efeito elicitor foi obtido com a aplicação de 0,50 mM de AS, resultando em maior valor econômico da matéria prima, devido ao aumento na produção de compostos secundários, tais como fenóis totais e óleo essencial, além de um concomitante aumento na atividade antioxidante do extrato vegetal.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; JAFARPOUR, M.; ZEINALI, H. Effect of various Salicylic Acid concentrations on growth of *Aloe vera* L. **International Journal of Agriculture Science**, v. 1, p. 311-313, 2011.

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**, v. 16, p. 825-830, 2014.

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**, v. 25, p. 613-620, 2006.

AL-TAWAHA, A. M. et al. Biotic elicitors as a means of increasing isoflavone concentration of soybean seeds. **Annals of Applied Biology**, v. 146, p. 303-310, 2005.

ANDENBERG, A. A. et al. Compositae. In: KUBITZKI, K.; KADEREIT J. W. **Flowering plants eudicots asterales**. The families and genera of vascular plants. Springer – Verlag. v.8, p. 61- 588, 2007.

ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 8, p. 53–63, 1999.

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**, v. 37, p. 01-14, 2015.

BAENAS, N. et al. Radish sprouts - Characterization and elicitation of novel varieties rich in anthocyanins. **Food Research International**, v. 69, p. 305–312, 2015.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. v.3, p. 237-315.

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

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

BLUM, A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, p. 1159-1168, 2005.

BOHNERT, H. J., JENSEN, R. G. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, v. 14, p. 89–97, 1996.

BRANT, R. S. et al. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1401-1407, 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: 9 fev. 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

CHANDLER, R. F.; HOOPER, S. N.; HARVEY, M. J. Ethnobotany and phytochemistry of yarrow *Achillea millefolium* compositae. **Economic Botany**, v. 36, p. 203-223, 1982.

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais – do cultivo à terapêutica**. 2. ed. Petrópolis: Vozes, 1998. 246p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2002. v. 2, p. 195-248.

DAVIES, P. J. Plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: Davies, P. J. (ed). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action**, kluwer . London: Academic Publishers, 2004. p.1-15.

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**. v. 56 , p. 101-110, 2014.

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**. v. 4, p. 119-124, 2015.

FOTI, M. et al. Antioxidant activity of phenolic meroditerpenoids from marine algae. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 26, p. 159–164, 1994.

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**, v.13, p. 14828–14844, 2012.

HAYAT, S. et al. Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. **Acta Agronomica Hungarica**, v. 53, p. 433–437, 2005.

HE, Y. L. et al. Thermotolerance related to antioxidation induced by salicylic acid and heat acclimation in tall fescue seedlings. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 28, p. 89-95, 2002.

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**, v. 1, p. 834-840, 2007.

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**, v. 3: p. 321-328, 2007.

JANDA, T. et al. Salicylic acid and photosynthesis: signaling and effects. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 1–10, 2014.

KAZEMI, M. Effect of foliar application with salicylic acid and methyl jasmonate on growth, flowering, yield and fruit quality of tomato. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 3, p. 154-158, 2014.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KIM, Y. H. et al. Exogenous application of plant growth regulators increased the total flavonoid content in *Taraxacum officinale* Wigg. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 5727-5732, 2009.

KOVÁČIK, J. et al. Salicylic acid induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. **Plant Cell Report**, v. 28, p. 134-143, 2009.

LEUNG, A. Y. **Enciclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics**. John Wiley: New York, 1980. 409p.

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

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. p. 129-130.

MOREIRA, D. L. et al. Antioxidant and antiviral properties of *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae) and of quebracho (*Schinopsis* sp.) extracts. **Química Nova**, v. 28, p. 421-425, 2005.

NAKAJIMA, N. J.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 24, p. 471- 478, 2001.

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

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

NOREEN, S. et al. Exogenous application of salicylic acid enhances antioxidative capacity in salt stressed sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 473-479, 2009.

NOURAFCAN, H. et al. Effects of salicylic acid on quality and quantity of essential oil components in *Lippia citriodora* H.B.K. **International Journal of Biosciences**, v. 5, p. 252-259, 2014.

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

PANIZZA, S. **Plantas que curam (cheiro de mato)**. 3. ed. São Paulo: IBRASA, 1998. 280p.

PARASHAR, A. et al. Salicylic acid enhances antioxidant system in *Brassica juncea* grown under different levels of manganese. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 551–558, 2014.

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

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Nobel, 2009.

POPOVA, L.; PANCHEVA, T.; UZUNOVA, A. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v. 23, p. 85–93, 1997.

RADMAN, R. et al. Elicitation of plant and microbial systems. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 37, p. 91-102, 2003.

RICE-EVANS, C. A. et al. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375–383, 1995.

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

RUIZ-GARCÍA, Y.; GÓMEZ-PLAZA, E. Elicitors: a tool for improving fruit phenolic content. **Agriculture**, v.3, p.33-52, 2013.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN

AGRICULTURE, 4., Orlando-FL-USA: **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, p. 393-396, 2006.

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

SIMÕES, C. M. O. et al. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora URGs, 1998. 174p.

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

SIMS, D. A.; GAMON, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a widerange of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, p. 337-354, 2002.

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

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic- phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-158, 1965.

SRIVASTAVA, M. K.; DWIVEDI, U. N. Delaying ripening of banana fruits by salicylic acid. **Plant Science**, v. 158, p. 87-96, 2000.

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**, v. 268, p. 4086-4094, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

WADA, K. C. et al. Salicylic acid and the flowering gene Flowering Locus T homolog are involved in poor-nutrition stress-induced flowering of *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 447-452, 2010.

WASICKY, R.; AKISUE, G. Um aparelho aperfeiçoado para a extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 7, p. 339-405, 1969.

YEN, G.; DUH, P. D. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 629-632, 1994.

ZHANG, B. et al. Influence of the application of three different elicitors on soybean plants on the concentrations of several isoflavones in soybean seeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 5548-5554, 2006.