



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA-BACHARELADO

CARLOS EDUARDO CUNHA RÊGO

**EFEITO DA APLICAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO EM GENÓTIPOS DE
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) SOB ASPECTOS QUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS**

FORTALEZA

2017

CARLOS EDUARDO CUNHA RÊGO

**EFEITO DA APLICAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO EM GENÓTIPOS DE
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) SOB ASPECTOS QUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS**

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, pertencente ao Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho

FORTALEZA

2017

CARLOS EDUARDO CUNHA RÊGO

**EFEITOS DA APLICAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO EM GENÓTIPOS DE
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) SOB ASPECTOS QUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS**

Monografia apresentada ao Programa de Graduação
em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dr. Rosilene Oliveira Mesquita
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho a Deus, pela infinita bondade e misericórdia. Aos meus pais, familiares e amigos que foram pacientes, apoiando e confiando na minha capacidade mesmo quando nem mesmo eu acreditava que fosse possível, e por todo o amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tanta bondade e misericórdia ao decorrer de toda minha vida acadêmica. Por ter colocado em meu caminho sempre pessoas que acrescentam e acrescentaram coisas positivas.

Aos meus pais, que mesmo sem nenhuma instrução, souberam me educar em caminhos frutíferos. Gratidão por tanto amor, cuidado, paciência, orações, atenção e apoio. Obrigado por cada momento de conversa/puxão de orelha, se hoje sou o homem que sou, devo isso a vocês.

À minha avó Maria, minha segunda mãe. Meu coração se enche de orgulho e de alegria em poder ter a oportunidade de findar esta etapa da minha vida ao teu lado. Te sou grato por cada ensinamento ao longo desses seus 88 anos de vida e experiências divididas desde os seus 60. Eu não tenho melhores palavras para te dizer a não ser mostrar minha gratidão.

Aos meus irmãos, que trouxeram luz e razão à minha existência. Cada momento com vocês me faz voltar aos 15 anos de idade, trazendo à tona um misto de sentimentos, e recarregando minhas forças.

Aos meus amigos que a cada dia me fazem vencer o medo, me estimulam a superar todos os desafios. Carina Barros, você não tem ideia, mas o ser humano que você é me faz enxergar uma clara esperança nas pessoas, sua humanidade é um exemplo para mim e obrigado por ter me olhado sem pressa. Ao grupo “Os brodis do Vôlei”, composto por Narcélio Júnior, Felipe Moraes e Olavo Júnior, pelo qual no meio de tanta correria nos tornamos irmãos de mães diferentes. Ao grupo “Reveladores”, composto pelo Guilherme, Priscila, Luca, Débora, Janise, Juliany, Amanda, Ludmilla, e eu, no qual pudemos compartilhar diversos sentimentos, tristezas, alegrias, derrotas e vitórias. Crescemos juntos e vibramos juntos. Pudemos trabalhar juntos nossa paciência e o perdão ao próximo. Pude sondar o conceito de confidencialidade e de apoio com vocês. Muito obrigado.

À Hungria, país este em que vivi os melhores momentos da minha vida e que me recebeu de braços abertos como uma mãe recebe um filho em sua casa. Aos amigos conquistados que sem dúvida nenhuma levarei todos eles para o resto da minha vida. Obrigado pelo apoio e por tanto amor recebido Ambrus Máté, Diána Dömösi, Dániel Gombkötő, Tamás Győri, Dorottya Drávucz, Mariann Vakula, Kamilla Moldvai e a tantos outros que continuam nas minhas melhores memórias.

Ao Laboratório de Fisiologia de Plantas (LABFIVE) pelo acolhimento. Pela estrutura oferecida para que eu pudesse desenvolver esse trabalho e por todo o cuidado com os equipamentos e proteção individual e coletiva. Obrigado pelos ensinamentos durante os experimentos, palestras e seminários.

Aos colegas de laboratório Luckas, Stella, Dalton, Cibelle, Gyedre, Paulo André, Daniel Coelho e Lineker. Sempre me lembrarei das risadas durante os experimentos, ou na hora do café, e ainda do desespero quando os resultados não eram os esperados. Obrigado por me proporcionar momentos descontraídos, me fazer ter vontade de ir para o laboratório alguns momentos.

À Karol Roger, pela parceria no trabalho durante todo este tempo. Foi uma alegria e um grande aprendizado dividir tanto conhecimento, dúvidas e aflições. Obrigado pela paciência e por todo estímulo.

À Valeria, mestranda que pôde me dar muito apoio e participação ativa no projeto, sem seus esforços não teria chegado as conclusões necessárias. Grato.

Ao Prof. Humberto que me confiou responsabilidades e deu todo o suporte necessário para a minha formação. Obrigado pela disponibilidade em ajudar, pela paciência e pela objetividade e clareza nas explicações.

À banca por aceitar me avaliar, pela disponibilidade de tempo e pelos conselhos durante a execução do trabalho.

Ao Gilmar, secretário do curso de Biotecnologia, que sem dúvida alguma é também responsável por esta conquista. Exemplo de profissional e simpatia. Pela disponibilidade, agilidade, sabedoria, bom-humor, compreensão, atenção, e proximidade com os alunos.

Ao curso de Biotecnologia, pela amplitude de atuação e sempre proposto a crescer, por meio dos projetos de extensão e apoio dos professores envolvidos. Pelo empenho que se tem entre os discentes em se apoiarem, o que não costumo ver em outro curso, no compartilhamento de ideias, de dúvidas, solução de problemas em grupo dentre outros, o que favorece ainda mais para a unificação e crescimento do curso na universidade.

A CAPES pela concessão da bolsa de intercâmbio do Ciência sem Fronteiras, em que pude crescer tanto profissionalmente e pessoalmente.

“Eu te louvarei, porque de um modo assombroso, e tão maravilhoso fui feito; maravilhosas são as tuas obras, e a minha alma o sabe muito bem. ”

Salmos 139:14

RESUMO

O Manjericão (*Ocimum basilicum*) é uma planta perene da família Lamiaceae. Seus diferentes genótipos podem ser classificados em função do seu aroma ou por características morfológicas. Seu óleo essencial exerce importância na indústria de perfumaria, na aromatização de comidas e bebidas, apresentando ainda propriedades medicinais, inseticidas e repelentes. Uma substância que estimula as defesas das plantas é o ácido salicílico que induz mecanismos de resposta. O uso do Ácido Salicílico (AS) quando aplicado diretamente nas plantas, pode causar o mesmo efeito. A participação do AS em estimular a resistência sistêmica é inferida devido à sua capacidade de induzir a síntese de PR-Proteínas. Neste presente trabalho objetivou-se analisar os efeitos químicos por meio da determinação de compostos voláteis, e fisiológicos como massa seca da parte aérea e da raiz, trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos, sob administração do ácido salicílico em três diferentes genótipos do manjericão: Alfavaca Basilicão, Gennaro de Menta e Limoncino. De modo geral, houve um aumento de MSR e AF em todas as cultivares avaliadas, destacando-se o manjericão alfavaca basilicão com 56,4 e 35% de aumento, respectivamente. Além desses dois parâmetros a cultivar Gennaro de Menta apresentou também um incremento MSPA em torno de 15,4%. Alterações características da aplicação de AS sob trocas gasosas e teores de clorofilas *a* e carotenoides foram observados apenas na cultivar Limoncino enquanto as cultivares Alfavaca Basilicão e Gennaro de Menta apresentaram de modo geral diminuição desses parâmetros. Os compostos majoritários nas cultivares Alfavaca Basilicão foram Eucaliptol e Linalol, na cultivar Gennaro de Menta foram o Estragol e Eucalyptol e na cultivar Limoncino os compostos majoritários foram citral e estragol no controle enquanto que a aplicação de AS favoreceu o aparecimento de Geranial e Lemonal (isômeros do citral). As diferentes respostas obtidas neste trabalho refletem a complexidade de se trabalhar com plantas aromáticas e reforçam a importância do estudo de cultivares especialmente de *Ocimum basilicum*.

Palavras-chave: Compostos Voláteis. Microextração. GC-MS

ABSTRACT

Basil (*Ocimum basilicum*) is a perennial plant and belongs to the Lamiaceae family. Their genotypes can be classified according to their aroma or also by morphological characteristics. Its essential oil is of great importance in the perfumery industry and also in the aromatization of food and beverages, and still presents medicinal, insecticidal and repellent properties. A substance that stimulates the defenses of plants is salicylic acid (SA) which induces mechanisms of responses. The use of SA when applied directly to plants may have the same effect. The participation of SA in the expression of systemic resistance is because of its ability to induce the synthesis of PR-Proteins. This study aimed to analyze the chemical effects as the determination of volatile and physiological characteristics as aerial and root dry mass, gas exchange and photosynthetic pigments, under the administration of salicylic acid in three different genotypes of basil: Alfavaca Basilicão, Gennaro de Menta and Limoncino. Only the cultivar Gennaro showed sensitivity to the application of AS in relation to DMAP, with a gain of 15.4%. There was an increase of RDM in all analyzed genotypes. As for leaf area, all the varieties were responsive, Basilicão obtained a greater gain of 35%. The genotypes of Basilicão and Gennaro showed a reduction in their photosynthetic rates when treated with AS, while Limoncino showed a slight growth. The administration of AS promoted reduction of chlorophyll A contents of 11.5% and 4.5% for Alfavaca Basilicão and Gennaro, and an increase of 8.5% for Limoncino. Increase in chlorophyll B and total, were observed only in Gennaro. Carotenoids increased to Limoncino gain of 11.1%, and reduced to the other varieties. The major compounds in the Alfavaca Basilicão cultivars were Eucaliptol and Linalol, in the Gennaro de Menta cultivar were Estragol and Eucalyptol and in the Limoncino cultivar the major compounds were citral and estragol in the control, while the AS application favored the appearance of Geranial and Lemonal (isomers of citral). The different responses obtained here reflect the complexity of working with aromatic plants and reinforce the importance of studying cultivars especially *Ocimum basilicum*.

Keywords: Volatile compounds. Microextraction. GC-MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estruturas químicas dos quimiotipos mais abundantes no <i>O. basilicum</i>	20
Figura 2: Processo de Resistência Sistêmica Adquirida (SRA)	23
Figura 3: Biossíntese do ácido salicílico em plantas	25
Figura 4: Aparelho integrador de área foliar (Licor 3100).....	30
Figura 5: Analisador de fotossíntese LI6400-XT.....	30
Figura 6: Fenótipo das plantas de <i>O. basilicum</i> após o sétimo dia de aplicação de 2,8mM de Ácido Salicílico por aspersão	34
Figura 7: Via biossintética dos Terpenos em plantas	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil dos compostos voláteis majoritários do Manjericão Alfavaca Basilicão submetidos à aplicação de 2,8mM de Ácido Salicílico por aspersão.....	42
Tabela 2: Perfil dos compostos voláteis majoritários do Manjericão Gennaro de Menta submetidos à aplicação de 2,8mM de Ácido Salicílico por aspersão.....	45
Tabela 3: Perfil dos compostos voláteis majoritários do Manjericão Limoncino submetidos à aplicação de 2,8mM de Ácido Salicílico por aspersão.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Perfil de Massa da Matéria Seca da Parte Aérea e das Raízes das plantas de <i>O. basilicum</i> em (g).....	35
Gráfico 2: Perfil das medidas de Área Foliar em plantas de <i>O. Basilicum</i> em (cm ²).....	36
Gráfico 3: Dados comparativos de Fotossíntese, Condutância estomática e Transpiração em três genótipos de plantas de <i>O. Basilicum</i>	38
Gráfico 4: Comportamento dos pigmentos fotossintetizantes em plantas de <i>O. Basilicum</i> , valores dados em µg.ml ⁻¹ .cm ⁻²	40
Gráfico 5: Número total de voláteis em valores absolutos para cada cultivar analisada.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	- Micrômetro
A	- Absorbância
AS	- Ácido Salicílico
BA2H	- Ácido benzoico 2-hidrolase
Cl _a	- Clorofila <i>a</i>
Cl _b	- Clorofila <i>b</i>
Cl _t	- Clorofila Total
CVOMT	- Enzima chavicol o-metiltransferase
DMAP	- Dimetilalil pirofosfato
GC-MS	-Cromatografia gasosa com espectrometria de massa
gs	-Condutância Estômática
ICS	- Isocorismato sintase
IPP	- Isopentenil Pirofosfato
KI	- Índice de Kovats
MAV	- Ácido mevalônico
MEP	- Metileritritol fosfato
mL	- Mililitros
mM	- Milimolar
MSPA	- Massa Seca da Parte Aérea
MSR	- Massa Seca da Raiz
PAL	- Fenilalanina amônia liase
PL	- Piruvato liase
RH	- Resposta Hipersensível
RTS	- Rota de Transdução de Sinais
SDE	- Extração Simultânea de Destilação
SPME	- Microextração em fase sólida
SRA	- Resistência Sistêmica Adquirida
TMV	- Vírus do Mosaico do Tabaco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Diversidade de Manjericões.....	18
2.2. Óleo essencial	19
2.3. Cultivo	20
2.4. Compostos Voláteis	21
2.5. Resistência Sistêmica Adquirida (SRA).....	22
2.6. PR-Proteínas	23
2.7. Ácido salicílico	24
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivos Gerais	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Germinação	28
4.2. Hidroponia	28
4.3. Aplicação dos Tratamentos.....	29
4.4. Análises.....	29
4.4.1. Determinação de massa fresca da parte aérea e da raiz.....	29
4.4.2. Determinação de massa seca da parte aérea e da raiz.....	29
4.4.3. Determinação da área foliar.....	29
4.4.4. Trocas Gagosas.....	30
4.4.5. Determinação de pigmentos fotossintéticos: Clorofila a e b, Clorofila Total e carotenóides	31
4.4.6. Análise de Compostos Voláteis por GC-MS.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Parâmetros de Crescimento.....	34
5.2. Condutância Estômática, Fotossíntese e Transpiração	37
5.3. Clorofila a, Clorofila b, Clorofila Total e Carotenóides	39
5.4. Compostos Voláteis por GC-MS	40
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a utilização de plantas aromáticas, condimentares e medicinais vem ganhando destaque e importância mundialmente, devido à grande preocupação da população em encontrar meios mais saudáveis, que possam substituir a presença do sal em diversos tipos de alimentos. Essas ervas possuem a capacidade de conferir sabor eficientemente, sem maiores danos à saúde. Ainda podemos citar as importantes propriedades medicinais que lhe conferem, despertando forte interesse em maiores estudos ao redor do mundo. O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) possui um destaque por possuir diversas finalidades, podendo ser utilizadas como plantas ornamentais, condimentar, medicinal, aromática, na indústria farmacêutica e de cosméticos, e ainda para a produção de óleo essencial, de forma que esta última é a mais valorizada.

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) pertence à família Lamiaceae. As plantas dessa família apresentam estruturas que secretam os óleos essenciais, os tricomas glandulares. Essas estruturas possuem variações em relação ao número de células secretoras, o comprimento da célula peduncular, a quantidade do óleo secretado, a densidade e seu arranjo na epiderme.

O manjeriço possui linalol e metilcavicol como componentes de maior percentual no óleo essencial. Esses elementos são bastante valorizados pela indústria farmacêutica e os teores desses produtos variam de acordo com a cultivar. Essas variações podem estar no fato de a produção dos componentes dos óleos essenciais dessas espécies ocorrer em mais de uma via metabólica. Esses diversos compostos aromatizantes em diferentes variedades de manjeriço, como o Metilcavicol, Eucaliptol, Citral, Eugenol, Linalol e Cânfora são comercializados nos mercados internacionais de óleos essenciais.

Como fitoterápico, o manjeriço pode ser utilizado para solucionar problemas nas vias respiratórias, combater infecções bacterianas e parasitas intestinais, além de melhorar a digestão alimentar. No Brasil, segundo o Ministério da Agricultura existem 37 cultivares registradas, porém calcula-se que de maneira geral, existem mais de 60 variedades de manjeriço no mundo, e elas apresentam fertilização cruzada, o que facilita hibridações, resultando em um grande número de subespécies e variedades com diferentes arquiteturas.

A planta de manjeriço se desenvolve bem em locais de clima quentes e amenos, portanto no Brasil, por apresentar uma grande extensão territorial e conseqüentemente condições edafoclimáticas variadas, a planta pode sofrer interferência no seu

desenvolvimento tanto de forma positiva como negativa. Diante dessas adversidades, as plantas podem estar sujeitas a estresses causados por elicitores bióticos ou abióticos, promovendo um efeito cascata de reações bioquímicas em favor de criar mecanismos de respostas a esses agentes. Dessa forma, a indústria de defensivos tem desenvolvido moléculas capazes de protegerem uma cultura contra os patógenos causadores de doenças apenas pela indução de mecanismos de defesa da planta. Diversos trabalhos mostram o potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação tóxica direta, inibindo o crescimento, quanto pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas por exemplo, indicando a presença de moléculas com característica elicitora.

O entendimento das propriedades antimicrobianas e/ou elicitoras dos compostos secundários presentes nessa planta medicinal podem contribuir para a aquisição de novas técnicas de controle de doenças de plantas.

Neste trabalho foi utilizado o Ácido Salicílico (AS) como elicitor abiótico, visto que sua administração permite a sua interação com outros fitormônios, resultando em uma modificação do status hormonal da planta, e conseqüentemente em mudanças fisiológicas e químicas. O AS é amplamente distribuído nas plantas e atualmente é considerado como uma substância semelhante a hormônios, que desempenha um papel importante na regulação de uma série de processos fisiológicos da planta, incluindo a fotossíntese. O AS ainda é relatado como causador de modificações na morfologia e fisiologia das plantas e como indutor de mecanismos de proteção que melhora a resistência aos estresses bióticos e abióticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O mercado de ervas aromáticas frescas está se expandindo devido principalmente a uma mudança significativa no uso de condimentos de plantas, ervas secas tradicionais ou até mesmo da procura pelo material fresco e embalado. Além dos produtos industrializados, os naturais também têm muito a se desenvolver. A crescente preocupação com a saúde, que leva à redução do consumo de sal, impulsiona a demanda por ervas e especiarias, já que estas podem substituir o sal enquanto tempero dos alimentos. Ainda é importante ressaltar o caráter medicinal de diferentes ervas, tornando essa característica bem atraente para o mercado, visto que o uso de remédios à base de ervas remonta às tribos primitivas em que as mulheres se encarregavam de extrair das plantas os princípios ativos para utilizá-los na cura das doenças (SIMON *et al.*, 1999; JAVANMARDI *et al.*, 2002). A utilização de ervas para fins medicinais, a chamada fitoterapia, permite que o ser humano se reconecte com o ambiente, acessando os benefícios provenientes da natureza, para ajudar o organismo a normalizar funções fisiológicas prejudicadas, restaurar a imunidade enfraquecida, promover a desintoxicação e o rejuvenescimento (SIMON *et al.*, 1999).

O manjeriço pertence à família Lamiaceae, compreendendo no total algo em torno de 65 espécies, dentre elas o *Ocimum basilicum* L. uma planta perene que cresce em diferentes regiões ao redor do mundo (PATON; HARLEY & HARLEY, 1999). É uma planta originária da África, Índia e de outras regiões da Ásia, conhecida por seus galhos com muitas ramificações e folhas com formato oval. O manjeriço é comercializado no Brasil em forma de folhas secas e como óleo essencial, possuindo diversas propriedades farmacêuticas devido às suas atividades diuréticas e estimulantes, enquanto na indústria de perfumaria exerce importante papel por seu aroma. Estas propriedades devem-se às suas características que são resultado de variáveis componentes do seu óleo essencial, em particular, a presença de alguns componentes principais como o linalol, cânfora, eucaliptol e metilcavicol que mostram um padrão interessante e diferenciado, dependendo das regiões onde o manjeriço foi produzido (LEE *et al.*, 2005).

2.1. Diversidade de Manjeriços

Além dos tipos tradicionais de manjeriço, outras espécies de *Ocimum* foram introduzidas no comércio hortícola norte-americano com novos usos culinários e ornamentais e podem ser fontes potenciais de novos compostos aromáticos. Entretanto,

hibridização interespecífica e poliploidia, ocorrências comuns neste gênero (HARLEY *et al.*, 1992), criaram confusão taxonômica dificultando a compreensão da relação genética entre muitas espécies (GRAYNER *et al.*, 1996). Além disso, a taxonomia do manjeriço é complicada pela existência de numerosas variedades botânicas, nomes de cultivares e quimiotipos dentro das espécies que não se diferem significativamente quanto à morfologia (SIMON; QUINN & MURRAY, 1990).

No Brasil de acordo com o banco de dados do Registro Nacional de Cultivares (RNC), existem atualmente 37 registros de cultivares do manjeriço segundo o Ministério da Agricultura.

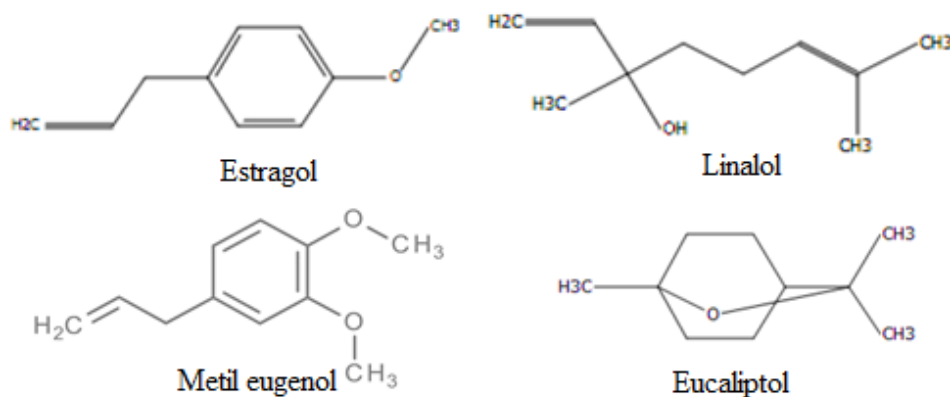
2.2. Óleo essencial

As folhas de manjeriço contendo óleos essenciais de aromas distintos podem ser usadas tanto frescas quanto secas para aromatizar vários tipos de alimentos. Além do uso culinário, o manjeriço foi tradicionalmente empregado como erva medicinal no tratamento de dores de cabeça, tosse, diarreia, constipação e ainda no mau funcionamento renal (GRAYNER *et al.*, 2004; ÖZCAN, ARSLAN & ÜNVER, 2005; POLITEO, JUKICA & MILOSA, 2007).

O processo de extração do óleo essencial de manjeriço é feito normalmente pelo processo de destilação (arraste de vapor), e o principal componente resultante desta extração é o linalol. O rendimento do óleo na massa fresca total da planta (folhas e ramos) gira em torno de 0,3 a 0,58% (MAY *et al.*, 2007).

A composição do óleo essencial determina os diferentes aromas das plantas e o sabor do condimento. Não é somente o tipo de cultivar que determina os compostos presentes no óleo, mas também as práticas agronômicas e as condições ambientais de crescimento (JIROVETZ *et al.*, 2003; VIÑA & MURILLO, 2003). Sobre esses fatores o eucaliptol, cinamato de metila, estragol e o linalol são em geral os principais componentes responsáveis pelo aroma característico (LEE *et al.*, 2005). Portanto, com base em mais de 200 análises de óleos essenciais extraídos do *Ocimum basilicum* L., Lawrence (1988) classificou os quatro principais quimiotipos mais abundantes no manjeriço (Figura 1): Metilcavicol (Estragol), Linalol, Metileugenol (aliveratrol), Cinamato de metila (Eucaliptol) e seus subtipos.

Figura 1: Estruturas químicas dos quimiotipos mais abundantes no *O. basilicum*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Devido à importância econômica da produção de óleo essencial, o manjeriço é considerado um alvo para a bioengenharia. Pouco se sabe sobre os genes que regulam a expressão dos fenilpropanóides, que são compostos orgânicos que servem como precursores de muitos polímeros naturais e que possuem diversas propriedades medicinais. Entender a associação destes compostos com a acumulação de óleos essenciais em diferentes condições ambientais poderia facilitar a produção de variedades economicamente valiosas de plantas medicinais através de técnicas de engenharia genética (SELMAR; KLEINWACHTER, 2013).

2.3. Cultivo

Para o cultivo em grandes áreas do manjeriço com finalidade de extração do óleo essencial, ou para produção de folhas desidratadas para mercados de plantas condimentares ou medicinais, é importante que se faça uma análise interdisciplinar do solo onde será implementada a cultura.

A obtenção de mudas pode ser feita através da germinação de sementes ou estacas herbáceas de plantas matrizes selecionadas pelo vigor e sanidade. Algumas variedades são sensíveis a patologias foliares e do sistema radicular e não se adaptam bem em locais de clima frio ou temperado. O espaçamento das plantas por hectare pode variar em função do sistema de cultivo escolhido. Para cultivo em pequenas áreas a distância entre as plantas recomendada varia entre 0,6m entre linhas e 0,4m entre plantas (MAY *et al.*, 2007).

2.4. Compostos Voláteis

Como já dito os óleos essenciais apresentam geralmente um odor bem agradável, e isso acontece devido a volatilização de alguns compostos presentes nesse extrato. As plantas eliminam substâncias para a atmosfera que as circundam.

O Manjeriço especificamente apresenta uma mistura complexa de substâncias voláteis (em sua maioria monoterpenos, sesquiterpenos e alguns de seus derivados oxigenados), apesar dessa variedade, estes compostos aparecem em baixas concentrações nas plantas (DIAZ-MAROTO; PERE'Z-COELHO; CABEZUDO, 2002; LUCCHESI; CHEMAT; SMADJA, 2004). Normalmente para as análises baseadas em óleos essenciais, eles devem ser extraídos e concentrados com procedimentos analíticos.

Existem vários métodos para a análise de compostos voláteis em plantas, destacam-se a extração à vapor, a extração com solvente (uso do Soxhlet), extração simultânea de destilação (SDE) e a microextração em fase sólida (SPME). Neste trabalho utilizamos o método de microextração em fase sólida (SPME – *Solid Phase Micro-Extraction*) que consiste em uma técnica que utiliza uma fase extratora sólida (polímero ou sólido adsorvente) e permite a realização de extrações em microescala eficientemente. A vantagem dessa extração em microescala é que ela não necessita de solventes orgânicos e a velocidade da reação é rápida. Desta maneira, esta técnica se baseia na absorção ou adsorção de analitos em uma fibra de sílica fundida revestida por um polímero, a qual está disponível comercialmente com outros polímeros de diferentes afinidades (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

Entretanto, é preciso estar atento ao tipo de método de extração/destilação utilizado, já que os mesmos podem gerar certas dificuldades, por exemplo, os monoterpenos são propensos a sofrer alterações químicas sob condições de uma destilação à vapor, e com uma extração convencional com solvente, é provável que haja uma perda de mais voláteis durante o processo de remoção do solvente (LUCCHESI; CHEMAT; SMADJA, 2004; CASTRO; JIMÉNEZ-CARMONA; FERNÁNDEZ-PÉREZ, 1999; POLLIEN *et al.*, 1998). Portanto, o método ideal para análise de voláteis é aquele que evita mudanças na composição química padrão do extrato da planta, utilize reduzida quantidade de solvente, menor automação e que seja rápido para evitar a volatilização destes compostos.

O procedimento SPME combina extração e concentração de analitos em uma etapa usando um dispositivo simples. Os voláteis da planta são concentrados em uma fibra revestida com a fase estacionária apropriada e posteriormente adsorvido na entrada

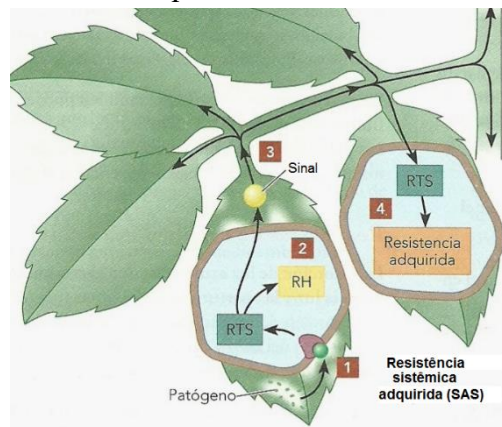
de injeção de GC quente para análise de cromatografia em fase gasosa. Um equilíbrio entre a quantidade de analito na matriz de amostra e na fase estacionária revestida com uma fibra de sílica fundida, é estabelecida. A quantidade de adsorvido / absorvido depende da partição do composto no *headspace*, da matriz da planta e também da partição entre o revestimento de fibra e o *headspace*. A técnica SPME, que reduz as alterações químicas dos analito e combinada com a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), foi reconhecida como um método eficiente, isento de solventes, adequado para análise de constituintes voláteis de vegetais, incluindo a espécie utilizada neste trabalho.

2.5. Resistência Sistêmica Adquirida (SRA)

A resistência sistêmica adquirida, é um rearranjo molecular de variadas vias metabólicas da planta com o propósito de induzir uma resistência ao ataque de um patógeno ou a condições de estresses a que ela possa estar submetida. Esse sistema abrange uma cascata de eventos e sinais que se inicia com a interação com fator biótico/abiótico e que leva a alterações no metabolismo celular, resultando na emissão de sinais moleculares dirigidos para as outras partes da planta (Figura 2), atuando de maneira não específica e promovendo a redução dos sintomas da patogenicidade (DURRANT; DONG 2004). Em resposta aos sinais emitidos, a planta é induzida a sintetizar seus agentes de defesa como as PR-Proteínas, do inglês, *Pathogen Related Proteins* (MARTINEZ *et al.*, 2000) e barreiras estruturais como a lignina (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2000).

O óxido nítrico, etileno, ácido jasmônico e o ácido salicílico podem ser exemplos claros de agentes sinalizadores da SRA.

Figura 2: *Processo de Resistência Sistêmica Adquirida (SRA)*. 1) Interação do patógeno com o receptor de membrana. 2) Resposta hipersensível. 3) Sinal transportado para o sistema. 4) Resistência sistêmica adquirida.



Fonte: Blog - Apuntes de Fisiologia Vegetal.

2.6. PR-Proteínas

Este termo foi utilizado na intenção de descrever inúmeras proteínas extracelulares que se acumulavam em plantas de fumo infectadas com o vírus do mosaico do tabaco (TMV). Bowles (1990) estendeu essa definição acrescentando proteínas localizadas extra e intracelularmente, que se acumulavam em tecidos vegetais intactos ou em cultura de células após o tratamento com elicitores ou ataque de patógenos. Algumas dessas PR-Proteínas, apresentam-se em baixos níveis nas plantas de forma constitutiva. Existem algumas outras proteínas que não são detectadas em condições fisiológicas normais, somente após alguma injúria ou ataque de patógenos e/ou pragas e sob estresses (BERNARDS *et al.*, 1999; MARTINS-MIRANDA, 2002). A indução destas proteínas é controlada pela ação de moléculas sinalizadoras que são classificadas em dois tipos, conforme sua origem: endógenas (da própria planta), ou exógenas (do patógeno) (WYATT; PAN; KUC, 1991; REPKA, 1996; CHRISTENSEN *et al.*, 2002).

O incremento na expressão dos genes das PR-Proteínas pode ser causado por organismos vivos (indução biótica) ou por elicitores de origem abiótica. Dentre eles incluem-se o cloreto de mercúrio, etanol, bromo, ácido acetilsalicílico, ácido jasmônico, etileno, ácido salicílico e ácido 1,2,3-benzotiadiazol-7-carbotiólico (BTH) (BOLLER, 1985; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; OKUSHIMA *et al.*, 2000; LATUNDE-DADA; FERNANDES *et al.*, 2006). Acredita-se que a ativação de diversos genes para expressão das PR-Proteínas seja em decorrência da cascata de transdução de sinais mediada pelo ácido salicílico. Hammond-Kosack e Jones (2000) observaram que a ação

sinérgica do etileno e ácido salicílico promoveu alta indução na expressão de genes para PR-Proteínas.

Muitas dessas proteínas como, quitinases, glucanases e proteínas que se ligam à quitina, possuem não só atividade antifúngica como também atividade antibacteriana *in vitro*. A degradação de polissacarídeos estruturais da parede celular de fungos ou alterações na sua arquitetura promovidas por estas enzimas podem impossibilitar o desenvolvimento do microorganismo, impedindo o seu crescimento (ZAREIE; MELANSON; MURPHY, 2002).

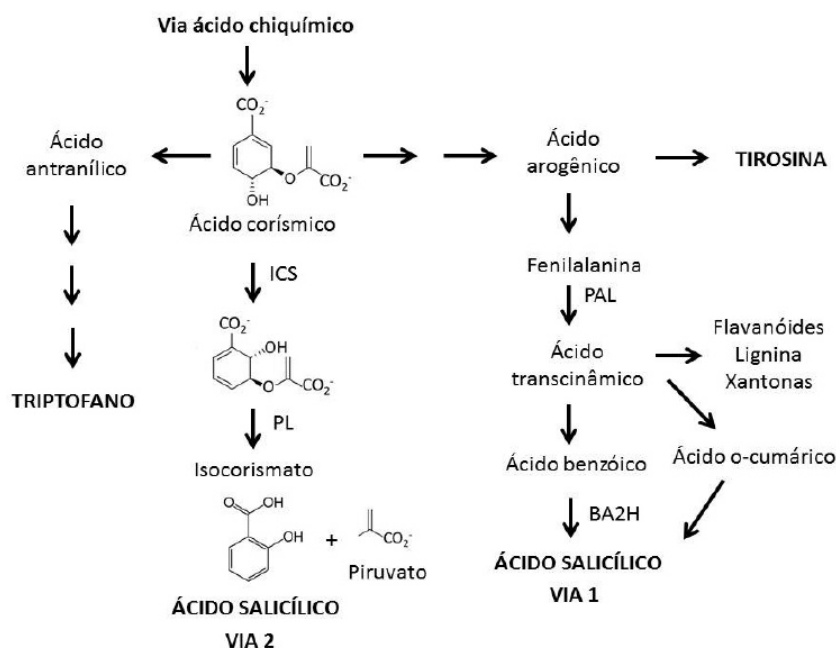
As PR-Proteínas são agrupadas entre elas de acordo com suas similaridades, baseadas nas suas características físico-químicas e imunológicas. Nas plantas estas proteínas são apresentadas nas formas de isoenzimas ou isoformas, apresentando entre si diferenças nas propriedades físico-químicas, particularmente em relação ao seu caráter catiônico ou aniônico (MELLON, 1991). As PR-Proteínas estão classificadas em 17 grupos, de acordo com suas características conforme descrito por Christensen e colaboradores (2002).

2.7. Ácido salicílico

Uma variedade de mensageiros secundários está envolvida em respostas e sinalização a diversos estresses, um deles é o ácido salicílico (AS) (DAT *et al.*, 1998), que nas plantas também é resultado da hidrólise do ácido acetil salicílico. Esta função sinalizadora foi proposta devido a capacidade que o AS têm de se acumular em plantas submetidas a situações adversas, seja pelo ataque patogênico ou pela indução de elicitores químicos e por sua propriedade de induzir a expressão de genes ligados a várias proteínas de resistência. Pertence ao grupo diverso dos compostos fenólicos (substâncias com um anel aromático ligado a um grupo hidroxil ou derivado funcional).

A biossíntese de AS nas plantas assim como o da grande maioria dos compostos fenólicos depende da biossíntese de fenilalanina, que é sintetizada a partir da eritrose 4-fosfato e do fosfoenolpiruvato, por meio de reações que compõem a via do Shikimato/Arogenato. A fenilalanina que é formada se converte em transcinamato, por meio da ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL). O transcinamato pode seguir então para duas vias. Na primeira delas haveria formação do ácido benzoico, que após a ação da enzima ácido benzoico 2-hidroxilase, se converteria em AS (Figura 3). Na outra, o transcinamato seria hidroxilado a ácido 2-cumárico que seria então oxidado a AS (RYALS; UKNES; WARD, 1994; STRACK, 1997).

Figura 3: Biossíntese do ácido salicílico em plantas. As abreviaturas das enzimas referem-se a: isocorismato sintase (ICS), piruvato liase (PL), fenilalanina amônia liase (PAL) e ácido benzóico 2-hidrolase (BA2H).



Fonte: MARTÍN, 2009.

Diversos estudos apontam a via principal de biossíntese de AS, como sendo a via cujo intermediário é o ácido benzoico, essa afirmação é devido a verificação do aumento da concentração da enzima 2-hidroxilase, que converte ácido benzoico em AS em plantas infectadas com o vírus do mosaico do tabaco (TMV), por exemplo. Ainda foi descrito por estudos anteriores que a aplicação exógena de AS, mas não de o-cumárico nas plantas também é capaz de induzir o acúmulo de AS, resistência ao TMV e a produção de uma das proteínas da SAR (Sistema de Resistência Adquirida) (YALPANI *et al.*, 1993).

Estudos já comprovaram que o AS não é a molécula sinalizadora para o desencadeamento da SAR, mas não há dúvidas de que esta molécula é essencial para o desencadeamento de todas as reações dos sistemas de defesa. Além dessa participação na SAR, o AS também é responsável pela ativação das funções efetoras da resistência no local da infecção. Essa observação nos leva a inferir que o AS é necessário não só para respostas sistêmicas específicas, mas também para respostas não-específicas, dessa forma abre-se um leque de questionamentos como: quantos mecanismos sinalizadores de resistência são dependentes dos níveis de AS; quantos não são; e através de quais

mecanismos estes sinalizadores induzem a SAR (GODIARD *et al.*, 1994). Pesquisas já demonstraram que o óxido nítrico por exemplo é requerido para que o AS funcione como um agente indutor da SAR (SONG; GOODMAN, 2001).

A aplicação do AS, dependendo da dose, pode inibir a germinação e o crescimento da planta, interferir na absorção das raízes, reduzir a transpiração, causar a abscisão das folhas e alterar o transporte de íons, induzindo uma rápida despolarização das membranas, ocasionando um colapso no potencial eletroquímico. Sendo assim, o ácido salicílico está envolvido na defesa das plantas contra o ataque de microorganismos como os fungos, bactérias e vírus. Tanto esse ácido quanto o ácido acetilsalicílico podem induzir a produção de pelo menos 5 grupos de proteínas relacionadas à patogenicidade, como a chiquinase e a β -1,3glucanase, mesmo na ausência do patógeno. Em algumas espécies de plantas já foi observado que existem diferentes proteínas atuantes como receptores do AS, destaque para as proteínas da família não relacionadas à patogênese (NRP). Estas proteínas se ligam ao AS, e interagem com fatores de transcrição específicos para reprogramar a expressão de genes requeridos para a defesa (SEYFFERTH; TSUDA, 2014). Devido à presença dessa complexa rede sinalizadora e ativação de defesa mediada pelo AS, tem sido proposta a utilização agrícola de elicitores sintéticos análogos ao AS, como forma de reduzir a aplicação de defensivos químicos que são altamente poluentes e prejudiciais à saúde humana (THAKUR; SOHAL, 2013). Alguns deles já comercializados em diversos países.

A busca pelo entendimento destes mecanismos é de extrema importância para a agricultura, que objetiva uma melhoria na produção de alimentos de origem vegetal em associação com a redução do uso de agrotóxicos danosos ao meio ambiente em diferentes níveis tróficos. Portanto, se torna de extrema relevância uma análise mais aprofundada dos efeitos fisiológicos e na composição química da aplicação direta do ácido salicílico em plantas aromáticas, incluindo possíveis variedades existentes visando um melhor uso da espécie e do ambiente de cultivo.

3. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram subdivididos em duas partes, objetivos gerais e objetivos específicos como descritos nos próximos tópicos.

3.1. *Objetivos Gerais*

O objetivo geral deste trabalho foi analisar os efeitos fisiológicos e químicos da aplicação direta do ácido salicílico em três cultivares de plantas de manjerição (*Ocimum basilicum* L.), são eles: Alfavaca Basilicão, Manjerição Limoncino e o Manjerição Gennaro de Menta.

3.2. *Objetivos Específicos*

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Analisar se a aplicação do Ácido salicílico interfere na fisiologia em três genótipos de manjerição (*O. basilicum* L.), quanto a características relacionadas com a parte aérea e raiz da planta, fotossíntese, condutância estomática e pigmentação fotossintética.
- Avaliar e identificar qualitativamente os compostos voláteis majoritários dos três genótipos quando submetidos à aplicação direta de Ácido salicílico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal - LABFIVE e na casa de vegetação, seu anexo, no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, no Campus do Pici situado na cidade de Fortaleza. Enquanto que a microextração (SPME) e determinação de compostos voláteis por GC-MS foram realizados no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical.

Ao realizar um planejamento de um experimento é necessário fazer a seleção dos fatores, ou seja, as variáveis que poderão interferir na resposta de interesse. Portanto, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, e foi dividido basicamente em quatro etapas: Germinação, Hidroponia, Aplicação dos Tratamentos e Análise.

4.1. Germinação

As sementes das cultivares foram adquiridas comercialmente da marca ISLA®, lavadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5% para desinfestação por 5 minutos e semeadas em recipientes plásticos de 200 mL contendo uma mistura de vermiculita e substrato orgânico comercial na proporção de 5:1. Os recipientes foram colocados em bandejas específicas para cada genótipo e dispostos na casa de vegetação em área arejada, e umedecidos com água regularmente por um período de 53 dias. Após este período as plantas foram transferidas para a hidroponia.

4.2. Hidroponia

Após o período de germinação as plantas foram transferidas para bandejas coletivas para cada variedade e irrigadas com Solução Nutritiva de Clark, renovando-a a cada dois dias para aclimatação, com aeração constante e pH mantido em 6,0 com adição de NaOH ou HCl 1M por um período de 10 dias. A solução Nutritiva proposta por Clark (1975) continha $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; KH_2PO_4 ; KNO_3 ; KCl; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (*dobro*); MgSO_4 ; Micronutrientes e Fe-EDTA (*meia força*).

4.3. Aplicação dos Tratamentos

Após a aclimação em hidroponia as mudas foram transplantadas duas a duas da mesma cultivar para cada balde contendo 3 litros da solução nutritiva de Clark, e dispostas no delineamento inteiramente casualizados, com cinco repetições. Foi preparado uma solução de ácido salicílico 2,8mM e borrifada diretamente nas folhas em dias alternados por 7 dias. A solução nutritiva também foi renovada a cada dois dias e o pH, mantido em 6,0 pela adição de NaOH ou HCl 1M. Ao final deste período, foram analisadas as trocas gasosas com auxílio do analisador de gás por infravermelho (IRGA). O material foi coletado ao fim do sétimo dia de aplicação para análises de massa fresca da parte aérea, da raiz e determinação da área foliar. Parte delas armazenadas e acondicionadas para análise de parâmetros fisiológicos como de massa seca da parte aérea e da raiz; Determinação de pigmentos fotossintéticos como a clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides, bem como para análise de parâmetros químicos.

4.4. Análises

4.4.1. Determinação de massa fresca da parte aérea e da raiz

No momento da coleta foi realizado a separação da parte aérea da planta do sistema radicular e a massa da matéria fresca determinada através da pesagem do material em balança analítica com precisão de três casas decimais.

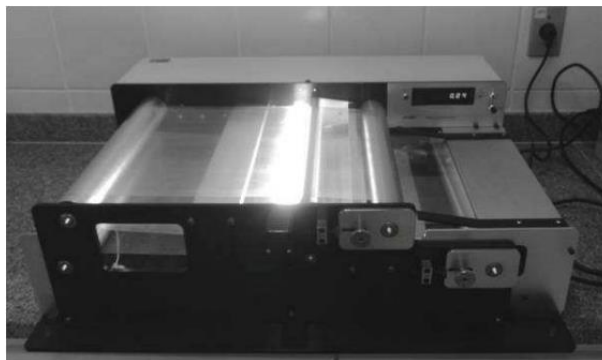
4.4.2. Determinação de massa seca da parte aérea e da raiz

A parte aérea foi separada da raiz e o material foi armazenado em sacos de papel, identificados e submetidos a secagem em estufa por aproximadamente 5 dias ou até que o material estivesse completamente seco, a uma temperatura de 60°C. Em seguida o material foi pesado em balança analítica.

4.4.3. Determinação da área foliar

O material fresco coletado foi submetido ao medidor de área foliar do modelo Licor 3100 (Licor Inc., Nebraska, EUA). O LI-3100 funciona em tempo real, ou seja, a área é aferida no momento em que a folha passa pelo sensor (Figura 4). Seu visor apresenta medidas de no mínimo 1 mm², resolução de até 0,1 mm², e apresenta uma precisão de $\pm 2,0\%$ para a resolução 1 mm² e $\pm 1,0\%$ para a resolução 0,1 mm². É um aparelho integrador de área, cuja teoria operacional baseia-se na simulação de células de grade, de área conhecida, na superfície foliar (LI-COR, 1996).

Figura 4: Aparelho integrador de área foliar (Licor 3100).



Fonte: Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, N.13; 2011.

4.4.4. Trocas Gagosas

A determinação da condutância estomática (g_s), e as leituras de fotossíntese das plantas do manjericão foi realizada no último dia do período de administração do AS, com a utilização de um analisador de gás por infravermelho do modelo Li-Cor LI6400-XT. O IRGA – do inglês *Infrared Gas Analyser*, é um equipamento composto pelo console (monitor), pinça (onde a folha é presa) e haste telescópica para coleta do ar. Foi levado em consideração para a análise um melhor horário do dia, no caso pela manhã (8:00 às 9:30), para não comprometer a atividade fotossintética. A planta e a folha utilizada para as leituras foram escolhidas baseada na qualidade visual apresentada. Os dados foram salvos no equipamento e uma planilha no Excel foi gerada para análise e organização dos resultados.

Figura 5: Analisador de fotossíntese LI6400-XT.



Fonte: Licor Inc., Nebraska, EUA.

4.4.5. Determinação de pigmentos fotossintéticos: Clorofila a e b, Clorofila Total e carotenóides

Foi determinado os teores de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb) e clorofila total (Clt) por meio do método descrito por Wellburn (1994). Três discos foliares com diâmetro de 1cm foi colocado em tubos de ensaio cobertos com papel alumínio, contendo 3mL de solução de dimetilsulfóxido saturada com CaCO₃. As amostras foram incubadas a 65°C em banho-maria por 30 min. Após as amostras atingirem a temperatura ambiente, os discos foram reservados e o extrato de pigmentos utilizado para a determinação das absorbâncias a 665, 649 e 480nm no espectrofotômetro. Os teores de Cla, Clb, Clt e carotenoides foram calculados com base nas equações e expressas em µg.ml⁻¹.cm⁻² de matéria fresca:

$$Cla = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649}); \quad (01)$$

$$Clb = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665}); \quad (02)$$

$$Clt = (7,15 \times A_{665}) - (18,71 \times A_{649}); \quad (03)$$

$$\text{Carotenóides} = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times Cla - 53,78 \times Clb) / 220 \quad (04)$$

4.4.6. Análise de Compostos Voláteis por GC-MS.

Todas as amostras de manjeriço (*O. basilicum* L.) foram coletadas em dezembro de 2016 da Casa de Vegetação anexo do Laboratório de Fisiologia Vegetal pertencente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. A primeira parte deste estudo, foi escolher um método (GC-MS) que fosse aplicável à determinação de voláteis em três genótipos do manjeriço. A metodologia foi adaptada do trabalho de Russell et al., 2008. Com o propósito de isolar estes voláteis, foi realizada inicialmente a calibração dos parâmetros que influenciam diretamente nas análises como revestimento das fibras, tempo de extração e temperatura. Para as análises as amostras foram dispostas para secagem em estufa a 40°C por 24h e pesadas posteriormente entre 0,3 e 0,4g deste material. Vials (frascos) de 20 mL foram utilizados e adicionados a cada um deles, 3g de cloreto de sódio dessecados a 80°C também por 24h, a amostra correspondente, 8 ml de água mili-Q (Merck Millipore®) e em seguida levados para o GC para início da avaliação.

As fibras SPME revestidas com divinilbenzeno / CarboxenTM / polidimetilsiloxano (50/30 μm StableFlex, DVB/CAR/PDMS), foram adquiridas da Sigma-Aldrich (EUA). Antes de usar, as fibras foram condicionadas seguindo as recomendações do fabricante. Todos os dias, antes do início das análises das amostras, realizou-se uma curta "limpeza térmica" das fibras em um injetor de GC (30 min a 250 °C) e uma corrida em branco. Os frascos de 20 mL (Sigma-Aldrich, EUA) foram limpos usando sonicação (20 min) em água com detergente, seguido de sonicação de 20 min em água destilada e acetona, p.a. (Penta, República Tcheca). Os frascos limpos foram após secagem para um forno a 220°C durante 4h cobertos com uma folha de alumínio. A microextração de fase sólida (SPME) utilizou uma fibra StableFlex DVB / CAR / PDMS 50/30 μm durante 5 min a 30°C. Os compostos extraídos foram adsorvidos termicamente a 250°C durante 1 min no orifício do injetor do cromatógrafo de gás, 0,25min foi o tempo de equilíbrio e 30min o tempo de captura.

A análise por GC-MS foi realizada em um instrumento Agilent modelo GC-7890B /MSD-5977A (quadrupolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna HP-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , Agilent Technologies Santa Clara, CA, United States), gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 260°C, temperatura do detector 150 °C, temperatura da linha de transferência 280°C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 40 °C, com rampa de aquecimento de 7 °C.min⁻¹ até 260 °C por 5 min ao término da corrida (36,5 min). O equipamento opera nas modalidades de injeção direta e injeção por SPME, portanto é necessário estar atento aos objetivos já que para cada injeção existe um *liner*, septo/porca de injeção e tipos de seringas específicos.

Com a obtenção do tempo de adsorção, RI's (Índices de Retenção) para cada composto detectado fornecidos após a corrida cromatográfica pelo equipamento, foi feita uma análise comparativa cruzando esses dados com a biblioteca virtual do NIST. A identificação dos componentes do óleo foi baseada em comparações dos tempos de retenções, pela determinação e comparação dos índices retenção de Kovats, e espectros de massas da biblioteca NIST com os índices descritos por Adams (1995). Nesta biblioteca é possível aferir se o espectro de massa dos quimiotipos sugeridos pelo equipamento é realmente dele, assim como o seu KI que é um tipo de índice de retenção. O Índice de Kovats (KI) foi introduzido em 1958 para ser utilizado em separações isotérmicas, e pode ser calculado empregando-se a equação 5:

$$KI = 100n + 100 \left(\frac{\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right) \quad (05)$$

Onde $t'R$ é o tempo de retenção ajustado (tempo de retenção do pico menos o tempo de eluição do pico de um composto não retido pela coluna cromatográfica).

i – analito

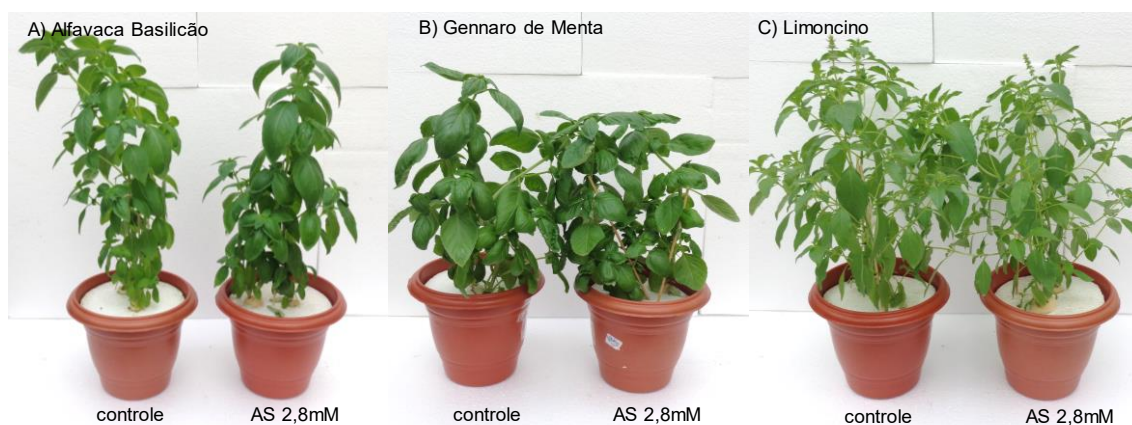
n – número de carbonos do padrão adjacente menos retido, e $n + 1$ é o número de carbonos do padrão adjacente mais retido.

A série de padrões de referência pode ser de alcanos, ésteres metílicos de ácidos graxos, alcoóis ou outra série homóloga de interesse, dependendo da natureza da fase estacionária e dos analitos de interesse. A verificação do KI é importante porque moléculas semelhantes possuem fragmentos semelhantes, desta maneira o índice de Kovats vai confirmar ou não o tempo de eluição do composto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Lucchesi (1987), um vegetal anual em condições ecológicas adequadas, ocupa no período de crescimento, em termos de percentagem, 10% para germinar, 6% para emergir, 51% no grande período de crescimento (fase linear), 15% para a reprodução, 8% na maturação e 10% até a colheita. Portanto, durante o seu desenvolvimento, o vegetal ocupa, nas diferentes fases, diferentes períodos de crescimento, naturalmente afetados pelos fatores externos e os inerentes à própria planta. Portanto, para analisar todos os resultados abaixo, é preciso levar em consideração que todos os genótipos analisados, se tratavam de plantas jovens no ápice de seu período de crescimento (Figura 6). Considerando A, B e C, as variedades de Alfavaca Basilicão, Gennaro de Menta e Manjericão Limoncino, respectivamente.

Figura 6: Fenótipo das plantas de *O. basilicum* após o sétimo dia de aplicação de 2,8mM de Ácido Salicílico por aspersão. A. Manjericão Alfavaca Basilicão. B. Manjericão Gennaro de Menta. C. Manjericão Limoncino.



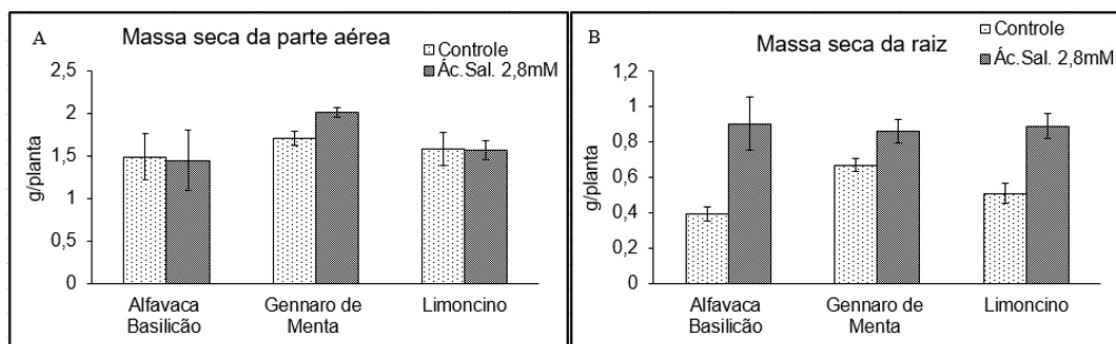
Fonte: Elaborado pelo autor

5.1. Parâmetros de Crescimento

Foram avaliadas as consequências da aplicação do AS quanto aos parâmetros de crescimento das plantas de manjericão. Considerando a massa seca da parte aérea (Gráfico 1A), apenas a cultivar Gennaro de Menta apresentou uma resposta positiva à aplicação de AS com um ganho de 18,1% em relação ao controle, enquanto os outros genótipos não apresentaram mudanças significativas. Por outro lado, a massa seca do sistema radicular aumentou em todas as cultivares avaliadas após a aplicação de AS (Figura 1B), dessa forma, no final do período experimental as plantas submetidas ao AS

apresentaram incrementos radiculares individuais diferenciados. Os genótipos Alfavaca Basilicão, Gennaro de Menta e Manjeriço Limoncino apresentaram um ganho de 125%, 30,3% e 78% respectivamente.

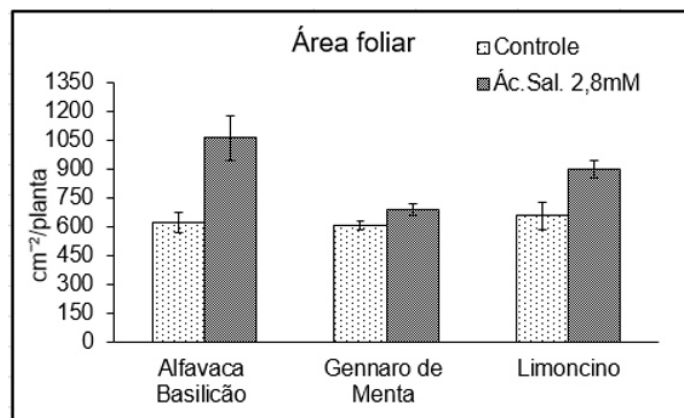
Gráfico 1: Perfil de Massa da Matéria Seca da Parte Aérea e das Raízes das plantas de *O. basilicum* em (g). Barras indicam o erro padrão das cinco repetições biológicas.



Fonte: Elaborado pelo autor

A área foliar também é considerada uma variável de crescimento reconhecida devido a sua importância como indicativo da produtividade da planta, uma vez que a fotossíntese realizada pelas plantas depende da interceptação da energia luminosa captada e da sua conversão em energia química. A eficiência do processo fotossintético depende da taxa de fotossíntese por unidade de área foliar e da interceptação da radiação solar, as quais são influenciadas pela arquitetura do dossel e pela dimensão do sistema fotoassimilador (FAVARIN *et al.*, 2002). Levando isso em consideração foram avaliadas as áreas foliares das três cultivares de manjeriço (Gráfico 2). Assim como na massa seca da raiz, a aplicação de 2.8mM de AS promoveu um incremento da área foliar nos três genótipos avaliados. Os resultados mostram que houve um aumento de 71,3%, 14%, 36,9% nos manjeriços Alfavaca Basilicão, Gennaro de Menta e Limoncino, respectivamente. O genótipo Alfavaca Basilicão se mostrou mais sensível neste parâmetro, seguido pelo Manjeriço Limoncino e com menor efeito no crescimento pelo Gennaro de Menta. Isso pode ter acontecido devido ao rearranjo bioquímico em decorrência da indução do AS e também das influências das condições externas da casa de vegetação como a quantidade de energia incidente, interceptada (área foliar), absorvida (excitação eletrônica), convertida (fixação de CO₂), redistribuídas entre as partes do vegetal e metabolizada nas diferentes partes das plantas (NASYROV, 1978).

Gráfico 2: Perfil das medidas de Área Foliar em plantas de *O. Basilicum* em (cm²). Barras indicam o erro padrão das cinco repetições biológicas.



Fonte: Elaborado pelo autor

É discutido na literatura que padrões normais de acúmulo de massa seca por uma cultura possibilitam melhor entendimento dos fatores relacionados à nutrição e, conseqüentemente, da adubação (VIEIRA *et al.*, 2002). Portanto diante dos resultados descritos anteriormente podemos inferir que além da luminosidade abundante da casa de cultivo, a disponibilidade de nutrientes na solução trocada a cada dois dias e a manutenção do pH ótimo ao longo do experimento podem ter sido primordiais para o crescimento nas três cultivares analisadas. Udagawa (1995) observou ao estudar plantas de tomilho, espécie também pertencente à família Lamiaceae que tanto a massa seca da parte aérea quanto teores de minerais (N, P, K, Ca e Mg) em folhas e raízes aumentam com níveis de nutrientes mais elevados na solução. Portanto, adicionalmente, o substrato orgânico, a solução nutritiva, acrescidos à dose de AS usada neste experimento podem ter exercido efeitos promotores de crescimento das três variedades durante a germinação e cultivo principalmente quando avaliados a matéria seca da raiz e área foliar.

Resultados semelhantes descritos na literatura destacam incrementos no peso seco e área foliar em genótipos de manjeriço (SILVA *et al.*, 2001), incluído a espécie *Ocimum basilicum* (MAIA *et al.*, 2001) e ainda em diferentes cultivares expostas a concentrações crescentes de AS (ELHINDI *et al.*, 2016). Além disso os resultados verificados estão em concordância com as observações em outras espécies de plantas, Agarwal *et al.* (2005) mostraram que em genótipos de trigo sob estresse hídrico, que o tratamento das plantas com AS refletiu em aumentos de área foliar e biomassa total, em

relação às plantas não tratadas. A área foliar representa a matéria prima para a fotossíntese e, como tal, é de grande importância para a produção de carboidratos, óleos, proteínas e fibras. Após o desenvolvimento do sistema radicular e a expansão das folhas, a planta retira água e nutrientes do substrato em que se desenvolve e inicia os processos anabólicos dependentes da fotossíntese. As folhas são gradualmente auto sombreadas, aumentando o índice de área foliar (IAF), passando a uma fase de crescimento linear, com o maior incremento na taxa de matéria seca como observado no gráfico 2 por exemplo. Quando água e nutrientes não são limitantes, o IAF poderá facilmente exceder o seu ótimo sem significar maior aumento em fitomassa.

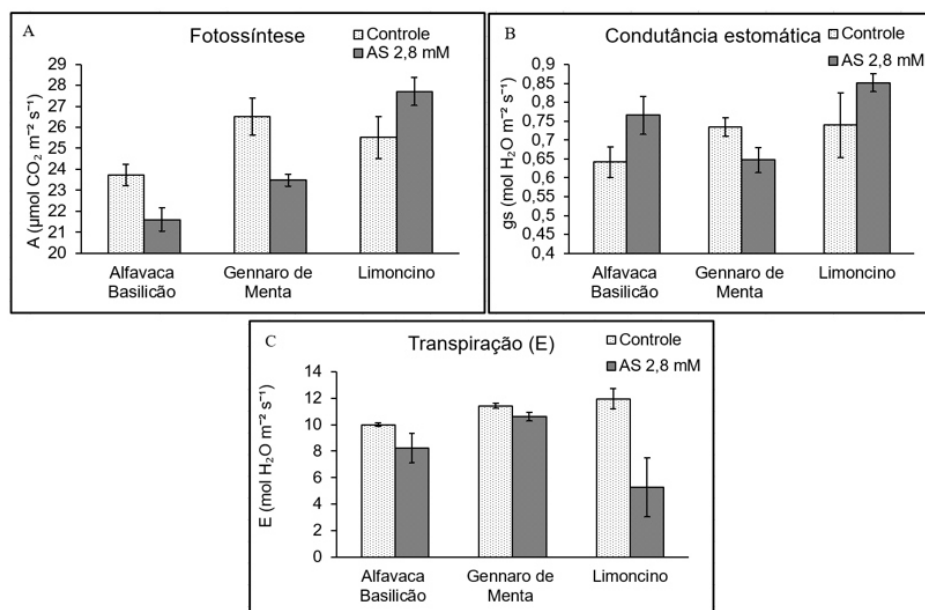
É importante destacar ainda a existência de interações cruzadas entre o AS e outros fitormônios não avaliados aqui, que refletem na regulação gênica (RIVAS-SANVICENT; PLASENCIA, 2011), e podem ter contribuído para este aumento da MSPA na cultivar Gennaro de Menta e da MSR em todas as cultivares. Ao atuar em coordenação com citocininas, etileno, auxinas, giberelinas, ácido jasmônico e ácido abscísico, o AS contribui, de forma importante, na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta. Consequentemente, a aplicação exógena de AS pode estar relacionada com modificações no status hormonal da planta, pelo aumento no conteúdo endógeno de giberelinas (KIM *et al.*, 2009) ou auxinas (SHAKIROVA *et al.*, 2003).

5.2. Condutância Estômática, Fotossíntese e Transpiração

As cultivares avaliadas apresentaram diferentes comportamentos nos parâmetros de trocas gasosas após a aplicação de AS. Os manjericões Alfavaca Basilicão e Gennaro de Menta apresentaram uma redução em suas taxas fotossintéticas quando submetidas ao tratamento com AS, enquanto a cultivar Limoncino apresentou um sensível aumento (Gráfico 3A). Os valores de condutância estômática (g_s) para a cultura do manjericão também não apresentaram um padrão entre as cultivares avaliadas (Gráfico 3B). Os genótipos Alfavaca Basilicão e Limoncino apresentaram impacto positivo, por outro lado um impacto negativo foi observado para a cultivar Gennaro de Menta. Além disso, para a cultivar de Alfavaca Basilicão o aumento na condutância estômática não significou aumento na taxa de fotossíntese, pelo contrário. Para o genótipo Gennaro de Menta, a sensível redução de g_s pode ter refletido para redução de fotossíntese. Para a variedade Limoncino o valor de g_s observado quando tratadas com AS indicam ocorrência de baixa limitação fotossintética, o que pode ter colaborado para a manutenção dos parâmetros fotossintéticos deste genótipo, mesmo com a imposição de estresse (Gráfico 3B). Todas

as cultivares avaliadas apresentaram impactos negativos na taxa transpiratória após a aplicação do AS. Entretanto, a cultivar Limoncino se mostrou mais sensível à dose de AS, seguido pelo Alfavaca Basilicão e por último o Gennaro de Menta, com reduções de 56%, 17,5% e 7%, respectivamente.

Gráfico 3: Dados comparativos de Fotossíntese, Condutância estomática e Transpiração em três genótipos de plantas de *O. Basilicum*. Barras indicam o erro padrão das cinco repetições biológicas.



Fonte: Elaborado pelo autor

A respiração é um processo de combustão lenta dos carboidratos produzidos na fotossíntese, resultando na liberação de energia armazenada nesses compostos que é utilizada para a manutenção do metabolismo vegetal e de todos os processos fisiológicos. Portanto, é de se esperar que, na medida em que a planta cresce, ocorra um aumento no processo respiratório, e conseqüentemente, a fotossíntese bruta terá de ser bem maior para atender às necessidades metabólicas do material existente e, ainda, promover adições de novos materiais, isto é, promover o crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Espera-se que a aplicação exógena de AS aumentaria significativamente a taxa fotossintética líquida, devido à melhora no estado funcional da maquinaria fotossintética em plantas, pela mobilização de nitrato no tecido interno ou ainda pela biossíntese de clorofila (SHI *et al.*, 2006), o que não foi observado totalmente no nosso trabalho. A melhora induzida pelo AS na taxa líquida de assimilação de CO_2 apenas na cultivar

Limoncino concorda com os resultados de pesquisas anteriores, onde o AS aplicado aumentou a capacidade fotossintética em várias culturas, por exemplo, soja (KHAN; PRITHIVIRAJ; SMITH, 2003), trigo (ARFAN; ATHAR; ASHRAF, 2007), incluindo *O. basilicum* (ELHINDI *et al.*, 2016) e girassol (NOREEN; ASHRAF, 2008). Esses resultados de parâmetros de trocas gasosas obtidos aqui mostram que as respostas das diferentes cultivares podem ser muito variáveis (MAIA *et al.*, 2017; BIONE *et al.*, 2014; HEIDARI, 2012) e reforçam a importância de experimentos envolvendo diferentes cultivares de *Ocimum basilicum*, visto que diante de 37 cultivares existentes as propriedades de cada uma delas e possíveis mecanismos de respostas podem ser completamente diferentes.

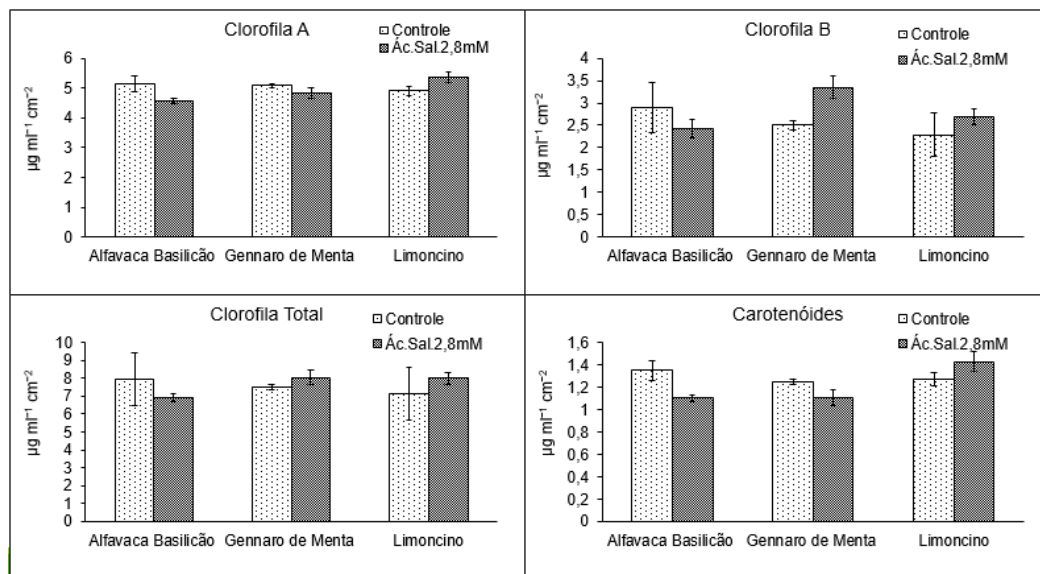
Além da influência do genótipo diversos fatores tais como luminosidade, radiação, inclusive estresses bióticos podem atuar sobre os estômatos e, conseqüentemente sobre a *g_s*, desta forma, fica visível o efeito da indução do AS sobre esse parâmetro, observando que o mesmo pode ser utilizado como indicador da situação adversa (Turner, 1974). Outro fator que pode ter contribuído para a variação no comportamento estomático e transpiratório da planta, observada durante o dia, pode ser a variação do ângulo de exposição das folhas aos raios solares, um importante mecanismo de defesa das plantas, que opera exatamente em períodos de estresse, diminuindo a temperatura foliar e, conseqüentemente, a transpiração estomatal.

5.3. Clorofila *a*, Clorofila *b*, Clorofila Total e Carotenóides

Foram determinados também teores de pigmentos fotossintetizantes nas plantas de manjerição após a aplicação do AS. De modo geral os dados mostrados no gráfico 4 corroboram os dados referentes a fotossíntese discutidos no item anterior. As diferenças nos teores de clorofila *a* e clorofila *b* encontradas nas folhas de manjerição sem administração de AS e com a aplicação dele, são muito pequenas e não seguem um padrão. Como já se sabe, a clorofila *a* é o tipo mais abundante, representando cerca de 75% de todos os pigmentos verdes encontrados nas plantas e possui papel fundamental no processo de fotossíntese atuando ativamente na produção de substâncias orgânicas. A aplicação do AS promoveu uma redução de 11,5% e 4,5% dos teores de clorofila *a* nas cultivares de Alfavaca Basilicão e Gennaro de Menta, respectivamente, e por outro lado promoveu um aumento de 9,5% na cultivar Limoncino (Gráfico 4A). Além disso foram observados aumentos de 33,6% nos teores de clorofila *b* (Gráfico 4B) e 6,9% de clorofila total (Gráfico 4C) apenas na cultivar Gennaro de Menta, enquanto que as outras cultivares

não foram responsivas à aplicação de AS. Após a aspersão do AS houve um decréscimo de carotenóides de aproximadamente 18,5% no genótipo de Alfavaca basilicão, redução de 11,2% em genótipo de Gennaro de Menta e de modo contrário foi observado um acréscimo no Manjericão limoncino, incremento este de 12,5% (Gráfico 4D).

Gráfico 4: Comportamento dos pigmentos fotossintetizantes em plantas de *O. Basilicum*, valores dados em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Barras indicam o erro padrão das cinco repetições biológicas.



Fonte: Elaborado pelo autor

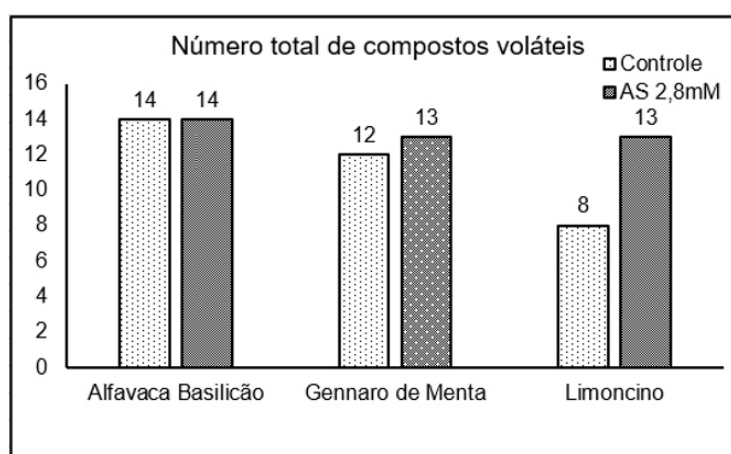
Os dados indicam que apenas a cultivar Limoncino se comporta de maneira similar à outros resultados descritos na literatura, visto que entre as alterações fisiológicas e bioquímicas das plantas, em resposta à aplicação de AS, são, também, acompanhados com aumentos consideráveis no conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides), em plantas sob condição normal ou estressante (SINGH; USHA, 2003), da mesma forma padrões diferentes de respostas a diferentes doses de AS foram observados por Delvari *et al.*, (2010) o que reflete na dificuldade de se trabalhar com plantas aromáticas com variedade de compostos, mesmo assim aumentos pequenos nos teores de clorofila *a* e carotenóides foram observados para essa cultivar.

5.4. Compostos Voláteis por GC-MS

Complementarmente, foi realizada a microextração dos compostos voláteis por SPME e os compostos majoritários para cada variedade foram determinados por meio de GC-MS para cada uma das cultivares Alfavaca Basilicão, Gennaro de menta e Limoncino.

De modo geral, as três cultivares não apresentaram um padrão no que diz respeito à composição volátil total, variando em diversos aspectos, porém é possível afirmar que o genótipo Limoncino apresentou-se mais responsivo à aplicação do AS, sendo que o número absoluto total de compostos nas cultivares Alfavaca Basilicão e Gennaro de Menta não tiveram alterações drásticas (gráfico 5). Análises cromatográficas em outras variedades de manjeriço também não têm identificado números grandes de compostos, Jordan e colaboradores (2017), avaliando três cultivares diferentes encontrou no máximo 28 compostos diferentes, sendo que fatores como genótipo, ambiente e perdas de compostos traços durante a extração podem ter influenciado nesses números.

Gráfico 5: Número total de voláteis em valores absolutos para cada cultivar analisada.



Fonte: Elaborado pelo autor

Os componentes majoritários da cultivar Alfavaca Basilicão de acordo com as porcentagens médias dos picos detectados no GC-MS foram o Eucaliptol e o Linalol (Tabela 1). Percebe-se que o tratamento com AS apresentou um aumento de 38,4% nos níveis de Eucaliptol enquanto que o Linalol não apresentou modificação significativa em seus níveis, por outro lado alguns compostos como β -Pinene obteve ganho de 15,4% e o pico de α -Pinene cresceu em 20% sua média mesmo que esses valores sejam bem menores do que os compostos majoritários. Outro compostos como Mirceno, Octen-3-ol e Sabineno apresentaram redução de seus valores quando submetidos à dose de AS, 75%, 47,2% e 31,1%, respectivamente. Ainda pode ser observado o aparecimento de compostos como o Metilciclohexanol e α -Terpineol, em detrimento do desaparecimento de Tujeno e α -Bergamoteno.

Tabela 1: Perfil dos compostos voláteis majoritários do Manjericão Alfavaca Basilicão submetidos à aplicação de 2,8mM de Ácido Salicílico por aspersão. IK_{eq} - Índice de Kovats calculado. IK_{lit} - Índice de Kovats por Adams (1995). X – Não detectado no tratamento.

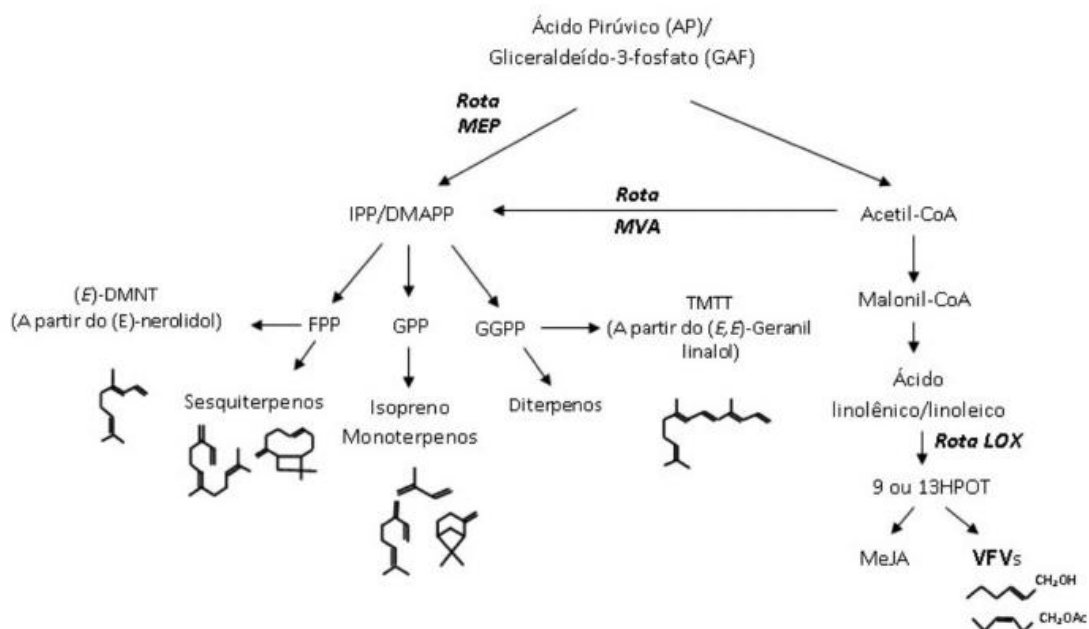
Composto	IK		Média Área Controle %	Desvio Controle	Média Área % AS 2,8mM	Desvio AS 2,8mM
	eq	IK lit				
4-Methylcyclohexanol	702	702	x		2,24	1,15
2-Hexenal	857	855	3,14	1,68	3,43	0,57
Thujene	924	924	1,27	0,04	x	
α -Pinene	931	931	4,02	0,21	6,21	0,78
Camphene	953	947	1,52	0,39	1,01	0,12
Sabinene	977	969	4,37	1,05	3,01	0,76
1-Octen-3-ol	982	986	5,95	1,53	3,14	0,43
β -Pinene	980	979	5,58	1,11	6,60	1,33
Myrcene	992	990	9,19	1,59	2,31	0,19
Eucalyptol	1036	1031	27,74	1,06	45,06	0,53
Ocimene	1051	1048	3,11	0,45	2,32	1,40
Linalol	1100	1101	22,42	3,47	22,24	3,31
Camphor	1150	1146	1,15	0,19	0,78	0,15
α -Terpineol	1194	1190	x		0,60	0,05
Eugenol	1365	1373	3,48	2,58	1,04	0,69
α -Bergamotene	1440	1433	7,07	0,98	x	

Fonte: Elaborado pelo autor

Como se é esperado esta espécie é rica em Terpenos, metabólitos secundários de origem vegetal, que apesar de não exercerem papel fundamental no metabolismo da planta, continuam de grande importância para o bom funcionamento da mesma (DI STASI, 1996), e a emissão destes compostos aumenta em plantas estressadas (ARO *et al.*, 2012), além disso a composição majoritária desta variedade de *O. basilicum* pertencente à família Lamiaceae, está em concordância com as observações realizadas por Lawrence (1988). Compostos majoritários de *O. basilicum* tem sido descritos na literatura como metilcavacol, linalol, 1,8-cineol e geranial (KHALID, 2016) e ainda incluem eugenol (EKREN *et al.*, 2012), metileugenol, α -bergamoteno e β -mirceno (MANDOULAKANI *et al.*, 2017), essa variedade de quimiotipos provavelmente se deve ao grande número de tipos diferentes de manjericão existentes, e as três cultivares escolhidas nesse trabalho refletem claramente que manjericões com quimiotipos diferentes também podem apresentar respostas fisiológicas diferentes.

Estes terpenos indentificados, no qual incluem o Eucaliptol, Linalol e β -pineno por exemplo, são derivados do isopreno, sintetizados e armazenados em glândulas encontradas na superfície de folhas, hastes e flores (IIJIMA *et al.*, 2004). Um de seus precursores, o ácido mevalônico é proveniente da união de duas unidades de acetil-CoA, porém ainda há uma outra via de formação desses componentes, a via que utiliza o metileritritol fosfato como precursor, sendo que esta primeira via acontece no Citosol e a segunda nos cloroplastos.

Figura 7: Via biossintética dos Terpenos em plantas. *MEP*: Metileritritol fosfato; *MVA*: Ácido mevalônico; *IPP*: Isopentenil difosfato; *DMAPP*: Dimetilalil pirofosfato; *FPP*: Farnesil difosfato; *GPP*: Geranil difosfato; *GGPP*: Geranil geranil difosfato.



Fonte: Adaptado de Schoonhoven *et al.*

Para a rota do mevalonato (MVA), unidade de isopreno é convertida em ácido mevalônico, que sofre fosforilação de duas hidroxilas. A fosforilação é seguida por uma eliminação envolvendo a perda de CO_2 e PO_4^{3-} , e o produto desta eliminação é o IPP. Em seguida acontece a isomerização do IPP em Dimetilalil pirofosfato (DMAP), pela enzima difosfato de isopentila isomerase. Para a via do metileritritol fosfato (MEP), temos inicialmente uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato, juntamente com uma molécula de piruvato, dando origem ao metileritritol fosfato, que será fosforilado dando origem ao DMAP. Neste ponto, as vias se encontram e a formação dos terpenos segue o mesmo caminho.

Em todo caso, MEP e/ou MVA irão originar duas importantes unidades C5 que são os precursores imediatos dos terpenos: isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAP). Em muitos casos o IPP e o DMAP ligam-se entre si através do famoso modelo "cabeça-cauda" para formar unidades maiores, conseqüentemente ampliando a variedade de terpenos encontrados em diversos tipos de vegetais.

Baseado nisso, a aplicação da dose de AS favoreceu o aumento dos níveis de Eucaliptol, Linalol e α -pineno, possivelmente devido à alta indução na expressão de genes que codificam PR-Proteínas. A ativação desses genes pode acontecer devido a uma cascata de transdução de sinais mediados por elicitores abióticos como o AS (BOLLER, 1985; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; OKUSHIMA *et al.*, 2000; LATUNDE-DADA; FERNANDES *et al.*, 2006). Essas proteínas específicas estão associadas diretamente aos processos de defesa do vegetal e desviaram o fluxo metabólico a favor da maior produção de compostos envolvidos neste mecanismo. Ainda podemos apontar o aumento da fosforilação do ácido mevalônico no citosol e/ou do metileritritol fosfato nos cloroplastos, como agentes estimulantes para o aumento dos níveis destes terpenos. Entretanto não houve favorecimento a formação de álcoois como o octen-3-ol. A redução dos níveis de Sabineno, pode ser explicada pelo favorecimento por parte da planta em priorizar terpenos de maior necessidade em caso de estresse, como o Eucaliptol, que exerce papel antimicrobiano, por exemplo.

Estudos apontam que em condições normais para algumas espécies, a disponibilidade de luz determina a quantidade do precursor de isoprenóides, o gliceraldeído-3-fosfato produzido pela fotossíntese, que também controla a disponibilidade de adenosina trifosfato (ATP) e de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (NIINEMETS *et al.*, 2004). Deste modo, há evidências da relação entre a emissão deste composto e a fotossíntese (NIINEMETS *et al.*, 2002; WILKINSON *et al.*, 2009), pois a produção do mesmo é estimulada pela luz e declina no escuro (SHAO *et al.*, 2001; SANADZE, 2004). É possível imaginar que o *O. basilicum*, em condições estressantes, apesar de apresentar uma redução em sua taxa fotossintética pode ter aumentado seus níveis de isoprenóides em favor do crescimento de Eucaliptol. Desta maneira, o quimiotipo majoritariamente identificado para a variedade Alfavaca Basilicão foi o Eucaliptol.

Para a cultivar Gennaro de menta os compostos majoritariamente identificados foram o Estragol, seguido pelo Eucaliptol (Tabela 2). O Estragol apresentou uma redução de 14,7% de seus níveis, enquanto o Eucaliptol aumentou em 25,2%. Para as plantas

tratadas com AS fica visível o aparecimento de compostos importantes como o 3-Carene e m-Cymene, e o desaparecimento de outros como o 1-Octen-3-ol e Mirceno. Ainda podemos avaliar que 2-Hexenal mostrou um decréscimo de 57% em suas médias, enquanto o β -Phellandrene apresentou um acréscimo de 52,2%.

Tabela 2: Perfil dos compostos voláteis majoritários do Manjeriço Gennaro de Menta submetidos à aplicação de 2,8mM de Ácido Salicílico por aspersão. IK_{eq} - Índice de Kovats calculado. IK_{lit} - Índice de Kovats por Adams (1995). X - Não detectado no tratamento.

Composto	IK_{eq}	IK_{lit}	Média Área % Controle	Desvio Controle	Média Área % AS 2,8mM	Desvio AS 2,8mM
4-Methylcyclohexanol	702	702	1,49	0,38	x	
2-Hexenal	857	855	3,42	0,37	1,47	0,36
methoxy-phenyl	913	911	1,14	0,14	x	
β -Thujene	931	927	x		0,55	0,08
Camphene	953	947	x		1,52	0,30
β -Phellandrene	977	985	1,47	0,09	3,08	0,16
β -Pinene	980	975	1,13	0,16	x	
1-Octen-3-ol	982	986	2,44	1,06	x	
Myrcene	992	990	1,84	0,68	x	
3-Carene	1012	1009	x		4,99	0,78
Benzene, 1,4-dichloro	1016	1014	x		0,31	0,05
m-Cymene	1028	1025	x		3,98	0,32
Limoneno	1032	1029	1,19	0,23	x	
Eucalyptol	1036	1031	11,17	1,87	14,94	0,13
γ -Terpinene	1062	1056	x		1,03	0,19
Terpinolene	1090	1083	x		1,07	0,29
Linalol	1100	1101	3,62	0,35	3,55	0,22
Camphor	1150	1146	x		0,36	0,07
Estragol	1200	1196	69,64	22,56	59,36	2,24
α -Bergamotene	1441	1433	1,47	0,26	x	

Fonte: Elaborado pelo autor

Diferentemente da variedade anterior, o composto majoritário para este genótipo é o Estragol, que é um fenilpropanóide. A biossíntese de compostos fenilpropanóides é produzida a partir da via do shikimato e regulada por vários grupos de reações enzimáticas através de canais metabólicos (DIXON *et al.*, 1992). Todos os fenilpropanóides são derivados de ácido cinâmico, que é formado a partir de fenilalanina pela ação de desaminação de fenilalanina amônia-liase (PAL). PAL é uma das enzimas mais importantes com um papel chave na regulação da produção de fenilpropanóides em plantas (ACHNINE *et al.*, 2004, IIJIMA *et al.*, 2004). A última etapa biossintética

envolvida na formação de estrogol (metilcavicol) é catalisada pela enzima chavicol o-metiltransferase (CVOMT) (GANG *et al.*, 2001, LEWINSOHN *et al.*, 2000).

Foi percebido que a dose de AS 2,8mM, pode não ter favorecido a ação das enzimas envolvidas no processo de biossíntese do Estragol, havendo em detrimento disso um favorecimento a biossíntese de terpenos comuns nesta espécie como o Eucaliptol e β -Phellandrene. Isso pode ter ocorrido devido a readequação bioquímica e transduções de sinais causadas pelo AS, em prol de uma síntese de compostos associados diretamente com a defesa da planta a estresse biótico. A planta pode ter respondido de forma que o Estragol, composto utilizado principalmente para atração de agentes polinizadores, não seria de total utilidade, priorizando a síntese de metabólitos secundários de maior atividade contra possíveis estresses. Além disso, o Estragol também é em sua minoria utilizado para proteção contra luz UV, o que pode explicar a redução nos níveis desse composto, mas não o seu total desaparecimento. Ainda assim, o Estragol foi o quimiotipo majoritário identificado para a cultivar Gennaro de Menta.

O manjeriço limoncino foi a variedade que apresentou um maior número de compostos voláteis após aplicação de AS e, portanto, a mais responsiva a ele (Gráfico 5). Os compostos majoritários identificados foram o Geranial, seguido pelo Lemonal. Ambos só puderam ser verificados após tratamento com AS 2,8mM, juntamente com outros compostos como o Nerol e o Mirceno, em detrimento do desaparecimento de 2-hexenal e Verbenol. Os compostos Limoneno, Citral, Estragol, 5-hepteno e o Linalol, apresentaram redução de suas médias em 80%, 77%, 63,3%, 63,2% e 55%, respectivamente. A ausência de lemonal e geranial no controle pode ser explicado pela presença dos isômeros citral.

O Citral ou comumente também chamado de Lemonal, pode ser qualquer um dos pares de terpenóides com fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$. Os dois compostos são isômeros duplos. O trans-isômero é conhecido por geranial ou citral A. O cis-isômero é conhecido como nerol ou citral B.

Tabela 3: Perfil dos compostos voláteis majoritários do Manjeriço Limoncino submetidos à aplicação de 2,8mM de Ácido Salicílico por aspersão. *IKeq* - Índice de Kovats calculado. *IKlit* - Índice de Kovats por Adams (1995). *X* – Não detectado no tratamento.

Composto	IK eq	IK lit	Média		Média	
			Área Controle %	Desvio Controle	Área % AS 2,8mM	Desvio AS 2,8mM
Isopentenil	737	740	x		1,22	0,48
2-Hexenal	857	855	11,39	0,13	x	x
5-Hepten-2-one	989	985	6,43	0,15	2,36	0,16
Mirceno	992	990	x		4,66	0,53
Cimeno	1026	1026	x		1,14	0,30
Limoneno	1032	1029	6,37	2,46	1,28	0,50
Ocimeno	1051	1050	4,43	1,17	0,90	0,21
Fenchona	1090	1083	x		1,71	0,81
Linalol	1101	1096	5,30	0,83	2,39	0,13
Verbenol	1185	1184	11,22	7,46	x	x
Estragol	1200	1196	17,96	0,99	6,58	0,67
Nerol	1232	1229	x		6,80	2,60
Citral	1274	1267	36,90	4,15	8,51	0,45
Lemonal	1258	1252	x		26,48	3,05
Geranial	1276	1267	x		35,97	4,79

Fonte: Elaborado pelo autor

A redução destes compostos citados anteriormente pode ter relação com a biossíntese em paralelo de Geranial e Lemonal quando induzidos por AS nesta cultivar, estes quimiotipos são derivados do GPP (Geranil difosfato) (Figura 7), e são modificados por álcoois desidrogenases e álcoois oxigenases para a formação do Citral. Geranial e Lemonal estão presentes em diversos óleos essenciais de plantas, em alguns deles majoritariamente presentes (BAKKALI et al., 2008). Garcia et al., (2008) demonstraram a atividade antimicrobiana do Lemonal frente à espécies fúngicas, tal componente tem apresentado ação contra algumas cepas bacterianas inclusive (SADDIQ; KHAYYAT, 2010). Portanto, a indução do AS pode ter desfavorecido à ação de enzimas relacionadas a conversão do Citral, promovendo o acúmulo destes isômeros, o que indica que a planta pode ter sinalizado uma maior produção destes compostos em decorrência do estresse a que era submetida em resposta à dose de ácido salicílico. O Geranial portanto, foi o quimiotipos mais abundante para o genótipo Limoncino.

6. CONCLUSÃO

A aplicação de AS nas folhas de manjeriço favoreceu uma tendência em promover o crescimento da planta por meio de incrementos na massa seca da raiz e da área foliar, o que sugere uma possível relação entre o ácido salicílico e outros fitormônios de crescimento da planta. Não houve um padrão de resposta ao AS em parâmetros de trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos. Os compostos voláteis majoritariamente identificados para as cultivares Alfavaca Basilicão, Gennaro de Menta e Limoncino foram o Eucaliptol, Estragol e o Geranial, respectivamente, indicando que desvios nos fluxos metabólicos estão envolvidas na formação destes compostos secundários. De todos os manjeriços, o Limoncino foi mais responsivo à aplicação de ácido salicílico. Baseado nos resultados deste trabalho, recomenda-se a administração do AS em prol do favorecimento dos mecanismos de defesa vegetal, e ainda da produção de compostos voláteis presentes no óleo essencial, de grande importância industrial e medicinal. Porém, mais estudos como análises da interação de ácido salicílico com outros fitormônios, análise da expressão gênica envolvida nos mecanismos de respostas e o estudo profundo dos fluxos metabólicos ainda se fazem necessários para resultados mais promissores.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, **Academic Press**, San Diego, 1995.
- ACHNINE, L.; BLANCAFLOR, E.B.; RASMUSSEN, S.; DIXON, R.A. Colocalization of L phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Cell**, v.16, p. 3098-3109, 2004.
- AGARWAL, S. et al. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 49, n. 4, p. 541-550, 2005
- APUNTES, F.G. Disponível em: <<http://fisiolvegetal.blogspot.com.br/2012/11/las-plantas-se-defienden-de-herbivoros.html>>. Acesso em: 08 de junho de 2017.
- ARFAN, M.; ARTHAR, 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. **J. Plant Physiol.**, p. 685-694, 2007.
- AROS, D. *et al.* Volatile emissions of scented *Alstroemeria* genotypes are dominated by terpenes, and a myrcene synthase gene is highly expressed in scented *Alstroemeria* flowers. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 7, p. 2739–2752, 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-75, 2008.
- BERNARDS, M.A.; FLEMING, W.D.; LLEWELLYN, D.B.; PRIEFER, R.; YANG, X.; SABATINO, A. et al. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. **Plant Physiology**, v. 121, p. 135–146, 1999.
- BIONE, M. A. A.; PAZ, V. P.; SILVA, F.; RIBAS, R. F.; SOARES, T. M. Crescimento e produção de manjeriço em sistema hidropônico NFT sob salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, p.1228-1234, 2014.
- BOLLER, T. Induction of hydrolases as a defense reaction against pathogens. In: KEY, J. L.; KOSUGE, T. (Ed.) **Cellular and Molecular Biology of Plant Stress**. New York: Alan R. Liss, p.247-262, 1985.
- BOWLES, D.; J. Defense related proteins in higher plants. **Biochemistry**, v. 59, p. 837-907, 1990.
- CASTRO, M. D. L.; JIMÉNEZ-CARMONA, M. M.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, V. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. **Trends in Analytical Chemistry**, Córdoba, v. 18, n. 11, p. 708-716, 1999.
- CHRISTENSEN, A. B.; CHO, B. H.; NÆSBY, M.; GREGERSEN, P. L.; BRANDT, J.; MADRIZ-ORDEÑA, K.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of

pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 3, n. 3, p. 135-144, 2002.

DAT, J.F.; LOPEZ-DELGADO, H.; FOYER, C.H.; SCOTT, I.M. Paralell changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 116, p. 1351-1357, 1998.

DIAZ, M. C.; PEREZ, M. S.; CABEZUDO, M. D. Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile componentes of Spices. **Chromatographia**. v. 55, p. 723–728, 2002.

DI STASI, L.C. Conceitos básicos na pesquisa de plantas medicinais. In: Plantas medicinais: arte e ciência. **Guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, p. 23-27, 1996.

DIXON, R.A.; CHOUDHARY, A.D.; DALKIN, K.; EDWARDS, R.; FAHRENDORF, T.; GOWRI, G.; HARRISON, M.J.; LAMB, C.J.; LOAKE, G.J.; MAXWELL, C.A.; ORR, J.; PAIVA, N.L. Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. In: Stafford, H.A., Ibrahim, R.K. (Eds.), **Phenolic Metabolism in Plants**. **Plenum press**, New York, p. 92-128, 1992.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Ann Rev Phytopathol**, v. 42, p. 185-209, 2004.

ELHINDI, K.M.; EL-DIN, A.S.; ELGORBAN, A.M. The impact of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating salt-induced adverse effects in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.23, p.1-10, 2016.

FAVARIN, J. L.; NETO, D. D. GARCIA, A.; VILLA NOVA, N. A.; FAVARIN, M. G. G. V. Equações para a estimativa do índice de área foliar do cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.6, p.769-773, 2002.

FERNANDES, C. F.; MORAES, V. C. P.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, p. 1040-1048, 2006.

GANG, D.R.; WANG, J.; DUDAREVA, N.; NAM, K.H.; SIMON, J.E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiol**. v. 125, p. 539-555, 2001.

GARCIA, R. et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.1, p.163-68, 2008.

GODIARD, L.; GRANT, M. R.; DIETRICH, R. A.; KIEDROWSKI, S.; DANGL, J. L. Perception and response in plant disease resistance. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 4, p. 662-671, 1994.

- GRAYER, R. J.; VIEIRA, R. F.; PRICE, A. M.; KITE, G. C.; SIMON, J. E.; & PATON, A. J. Characterization of cultivars within species of *Ocimum* by exudate flavonoid profiles. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 901–913, 2004.
- GRAYER, R.J.; KITE, G. C.; GOLDSTONE, F. J.; BRYAN, S.E.; PATON, A.; & PUTIEVSKY, E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry** v. 43, p. 1033–1039, 1996.
- HAMMERSCHMIDT, R. et al. Inducing resistance: a summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases. **Eur J Plant Pathol**, v. 107, p. 1-6, 2000.
- HAMMOND, K. E.; JONES, D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W., JONES, R. (Ed.) **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists. v. 21, p. 1102-1157, 2000.
- HARLEY, M. M.; PATON, A.; HARLEY, R. M.; & CADE, P.G. Pollen morphological studies in the tribe *Ocimeae* (*Nepetoideae*: Labiatae): *Ocimum* L. **Grana**. v. 31, p. 161–176, 1992.
- HEIDARI, M. Effects of salinity stress on growth, chlorophyll content and osmotic components of two basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.379-384, 2012.
- IJIMA, Y.; DAVIDOVICH, R.; FRIDMAN, E.; GANG, D.R.; BAR, E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. **Plant Physiol**. p. 136, 2004.
- JORDÁN, M. J.; QUÍLEZ, M.; LUNA, M. C.; BEKHRADI, F.; SOTOMAYOR, J. A.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, P.; GIL, M. I. Influence of water stress and storage time on preservation of the fresh volatile profile of three basil genotypes. **Food chemistry**, v. 221, p. 169-177, 2017.
- JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SHAFI, M. P.; & KANIAMPADY, M. M. Chemotaxonomical analysis of the essential aroma compounds of four different *Ocimum* species from southern India. **European Food Research Technology**, v. 217, p. 120–124, 2003.
- KHALID, A. Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). **Int. Agrophys**. v. 20, p. 289-296, 2006.
- KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. Photosynthetic response of corn and soybean to foliar application of salicylates. **J Plant Physiol**, v. 160, p. 485-492, 2003.
- KIM, Y. H. et al. Exogenous application of plant growth regulators increased the total flavonoid content in *Taraxacum officinale* (Wigg). **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 8, n. 21, p. 5727-5732, 2009.

LATUNDE-DADA, A. O. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 4, p. 187-198, 2001.

LAWRENCE, B. M. A further examination of the variation of *Ocimum basilicum* L.). **Flavors and fragrances: A world perspective**, p. 161–170. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. B.V., 1988.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; & LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, p. 131–137, 2005.

LICOR INC. Disponível em: < <https://www.licor.com/env/products/photosynthesis/>>. Acessado em: 07 de Junho de 2017.

LI-COR. LI 3100 area meter instruction manual. Lincoln: LICOR, 1996. 34p.

LISKENS, H.F.; JACKSON, J.F. **Plant volatile analysis**. New York: Springer, 1997.

LUCCHESI, M. E.; CHEMAT, F.; SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, p. 323–327, 2004.

LUCCHESI, A.A. Fatores da produção vegetal. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Associação Bras. para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1987.

MAIA, N. B.; BOVI, O. A.; PERECIN, M. B.; GRANJA, N. P. Crescimento e qualidade do óleo essencial de alfavaca-cravo em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, v. 19, 2001.

MANDOULAKANI, B.A.; ELHAM, E.; MORTEZA, G. The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). **Phytochemistry**, v. 139, p. 1-7, 2017.

MAPA. – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Banco de dados do Registro Nacional de Cultivares (RNC)** Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php> Acesso em: 19 de junho de 2017.

MARTINEZ, A.M.; DELGADO, J.V.; RODERO, A.; VEGAS-PLA, J.L. Genetic Structure of the Iberian pig breed using microsatellites. **Animal Genetics**, Oxford, v.31, p. 295-301, 2000.

MARTÍN, F. J. P. **Respuestas inducidas por ácido abscísico y ácido salicílico en las simbiosis de judía y alfalfa en estrés salino**. 395 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências, Universidade de Granada, Granada, 2009.

- MAY, A.; PINHEIRO, M.Q.; SACCONI, L.Q.; JESUS, J.P. Manjerição (*Ocimum basilicum* L.). **Instituto Agronômico – IAC - Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura**, 2007.
- NASYROV, Y. S. Genetic control of photosynthesis and improving of crop productivity. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 29, p. 215-237, 1978.
- NOREEN, S.; ASHRAF, M. Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid: growth and photosynthesis. **Pak. J. Bot.**, v. 40(4), p. 1657-1663, 2008.
- NIINEMETS, U.; HAUFF, K.; BERTIN, N.; TENHUNEN, J. D.; STEINBRECHER, R.; SEUFERT, G. Monoterpene emissions in relation to foliar photosynthetic and structural variables in Mediterranean evergreen *Quercus* species. **New Phytologist**, v. 153, p. 243-256, 2002.
- NIINEMETS, U.; LORETO, F.; REICHSTEIN, M. Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 180- 186, 2004.
- OKUSHIMA, Y.; KOIZUMI, N.; KUSANO, T.; SANO, H. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p. 479-488, 2000.
- ÖZCAN, M.; ARSLAN, D.; & ÜNVER, A. Effect of drying methods on the mineral content of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 375–379, 2005.
- PATON, A.; HARLEY, R.M.; & HARLEY, M. M. *Ocimum* – An overview of relationships and classification. **Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles**. Amsterdam: Harwood Academic, 1999.
- POLITEO, O.; JUKICA, M.; & MILOSA, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, v. 101, p. 379–385, 2007.
- POLLIEN, P.; OTT, A.; FAY, L. B.; MAIGNIAL, L.; & CHAINTREAU, A. Simultaneous distillation-extraction: preparative recovery of volatiles under mild conditions in batch or continuous operations. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 413–423, 1998.
- REPKA, V. Differential sensitivity of purified isoforms of cucumber anionic virus inducible peroxidase to exogenous proteases. **Acta Viral**. v. 43, p. 313-319, 1999.
- 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, 2011.

RUSSELL, L.; EBENEZER, O.; JOHN, M.; SMOOT & LUKASZ, L. Sulfur Volatiles in Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves: Possible Defense Mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Florida, v. 56, p. 8905 – 8910, 2008.

RYALS, J.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 104, p. 1109-1112, 1994.

SADDIQ, A.A.; KHAYYAT, S.A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. Pestic. **Biochem. Phys.** v. 98, p. 89-93, 2010.

SANADZE, G. A. Biogenic isoprene (a review). **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, p. 729-741, 2004.

SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Ind. Crop Prod.** v.42, p. 558-566, 2013.

SEYFFERTH, C.; TSUDA, K. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. **Frontiers in Plant Science**. Doi: 10.3389/fpls.2014.00697, 2014.

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

SHAO, M.; CZAPIEWSKI, K. V.; HEIDEN, A. C.; KOBEL, K.; KOMENDA, M. KOPPMANN, R.; WILDT, J. Volatile organic compound emissions from Scots pine: mechanisms and description by algorithms. **Journal of Geophysical Research**, v. 106, p. 20483-20491, 2001.

SHI, B.; LIN, L.; WANG, S.; GUO, Q.; ZHOU, H.; RONG, L. Identification and regulation of host genes related to Rice stripe virus symptom production. **New Phytol.** v. 209, p. 1106–1119, 2016.

SILVA, P. A.; BLANK, M. F.; ALVES, P. B.; SANTOS NETO, A; CARVALHO FILHO, J. L. S.; AMANCIO, V. F. Efeito da adubação mineral e orgânica e do horário de colheita em manjeriço doce. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, 2001.

SIMON, J.E.; QUINN, J.; & MURRAY, R.G. Basil: a source of essential oils. **Advances in new crops**. Timber Press. p. 484–489; Portland: OR, 1990.

SIMON, J. E.; MORALES, M. R.; PHIPPEN, W. B.; VIEIRA, R. F., & HAO, Z. A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In J. Janick (Ed.), **Perspectives on new crops and new uses**, Alexandria, VA: ASHS Press, p. 499-505, 1999.

SINGH, B.; 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, 2003.

SONG, F.; GOODMAN, R. M. Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, n. 12, p. 1458-1462, 2001.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M., HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. London: Academic Press; p. 387-416, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2009.

THAKUR, M.; SOHAL, B. Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. **ISRN Biochemistry**. Doi: 10.1155/2013/762412, 2013.

TURNER, N.C. Stomatal behavior and water status of maize, sorghum and tobacco under field conditions. II. At low soil water potential. **Plant Physiology**. Rockville, v.53, n.3, p.360-365, 1974.

UDAGAWA, Y. Some responses of dill (*Anethum graveolens*) and thyme (*Thymus vulgaris*), grown in hydroponic, to the concentration of nutrient solution. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 396, p. 203-210, 1995.

VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**. v. 23, p. 523-530, 2000.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant pathology**, Orlando, v. 55, p. 85-97, 1999.

VIEIRA, M. C.; HEREDIA Z., N. A.; RAMOS, M. B.; MONTEIRO, M. M. Produção de biomassa de *Mentha x villosa* em função de cama-de-aviário e épocas de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 20. n. 2, 2002.

VIÑA, A.; MURILLO, E. Essential Oil Composition from Twelve Varieties of Basil (*Ocimum* spp) Grown in Colombia. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, n.5, p.744-749, 2003.

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**, v. 144, p. 307-313, 1994.

WILKINSON, M. J.; MONSON, R. K.; TRAHAN, N.; LEE, S.; BROWN, E.; JACKSON, R. B.; POLLEY, H. W.; FAY, P. A. Leaf isoprene emission rate as a function of atmospheric CO₂ concentration. **Global Change Biology**, v. 15, p. 1189-1200, 2009.

WYATT, S. E.; PAN, S. Q.; KUC, J. β -1,3-Glucanase, chitinase, and peroxidase activities in tobacco tissues resistant and susceptible to blue mould as related to flowering, age and sucker development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 39, p. 433-440, 1991.

YALPANI, N.; LEÓN, J.; LAWTON, M. A.; RASKIN, I. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus inoculated tobacco. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 103, p. 315-321, 1993.

ZAREIE, R.; MELANSON, D. L.; MURPHY, P. J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n. 10, p. 1031-1039, 2002.