



Instituto de Biociências de Botucatu



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Botucatu



Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Botânica)

ANÁLISE DE CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS,
POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ÓLEO ESSENCIAL DE
Origanum vulgare L. ssp. *vulgare*.

THAÍS RIBEIRO CARBONI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

Botucatu – SP

2013



Instituto de Biociências de Botucatu



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Campus de Botucatu



Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Botânica)

ANÁLISE DE CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS,
POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ÓLEO ESSENCIAL DE
Origanum vulgare L. ssp. *vulgare*.

THAÍS RIBEIRO CARBONI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Carboni, Thaís Ribeiro.

Análise de crescimento, trocas gasosas, potencial antioxidante e óleo essencial de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* / Thaís Ribeiro Carboni. – Botucatu, 2013.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Carmen Sílvia Fernandes Boaro

Capes: 20303009

1. Orégano. 2. Hidroponia. 3. Alimentos – Teor mineral. 4. Terpenos.

Palavras-chave: Hidroponia; Índices fisiológicos; Nutrição mineral; Orégano; Terpenos.

“Quem me vê sempre parado, distante
garante que eu não sei sambar.

...

Tou me guardando pra quando
o carnaval chegar...”

(Chico Buarque)

Dedico ao grande amor da minha vida,

Lavinia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha filha Lavínia que me inspira todos os dias a ser uma pessoa melhor. É por você que eu acordo com um sorriso no rosto e com a esperança de um futuro promissor.

Ao Vander, que me deu todo o amor e suporte de que precisei, sempre acreditando na minha capacidade, mesmo nos momentos em que eu mesma não acreditei. É em você que eu deposito toda a minha confiança para cuidar da nossa bonequinha. Minha aliança com você é eterna.

Aos meus pais Alberto e Cida, que mesmo de forma simples, puderam me proporcionar condições ímpares de vida para que eu pudesse ter tudo o que eles, por inúmeros motivos, não tiveram. Passaram por dificuldades, mas sempre andaram de mãos dadas prezando pela minha formação. São a minha base sólida e os braços para onde sempre poderei correr.

Ao meu irmão Bruno, que mesmo distante, sempre manteve seu coração junto ao meu. É um orgulho ver que entregamos para o mundo um homem que sabe fazer a diferença, que respeita o seu semelhante e busca incansavelmente a sua felicidade pessoal. São dele os olhos mais verdes e cheios de verdade que conheço.

À minha família, em especial a minha avó Nilva, por me guardar em suas orações, a minha tia Rosa, pela garra e exemplo de vida, aos meus primos Rafael, Alexandre e Adriana, pela parceria carinhosa em todos os nossos esperados encontros e a minha nova família Berti, que sempre me acolheu como uma filha.

À Prof^a Carmen Sílvia Fernandes Boaro pela orientação e por depositar sua confiança em mim, desde o primeiro momento em que nos conhecemos. Como lhe é peculiar, foi sempre muito sensível e compreensiva, principalmente nesta última etapa do trabalho.

À Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques pela educação e carinho com que me recebeu em seus laboratórios. Seu comprometimento com a qualidade em suas pesquisas me deu muito mais segurança para continuar o meu trabalho.

Ao Prof^o João Domingos que é meu eterno e querido patrono. Seus ensinamentos transcendem a relação professor-aluno, e por ele tenho toda a admiração e respeito.

À Prof^a Giuseppina Pace Pereira Lima pela amizade, parceria e companheirismo, me fazendo rir das minhas próprias falhas e me motivando sempre a seguir em frente.

À Prof^a Tatiane Maria Rodrigues e ao Prof^o Luiz Fernando Rolim de Almeida pela tranquilidade, otimismo e paciência.

A todos os outros docentes do Departamento de Botânica que também foram meus professores e agregaram muito valor a minha formação.

A todos os funcionários do Departamento de Botânica, em especial aos meus amigos Maria Helena, José Eduardo, Auro, Ana Paula, Hildebrando, Marcos e Kléber, e as queridas amigas do Herbário, Maria Raquel, Patrícia e Suzana. Sem a ajuda de todos vocês, com toda certeza, esse caminho teria sido muito mais longo.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, em especial a Luciana, Luciene, Herivaldo e Davi que sempre foram muito solícitos e atenciosos.

A todos os funcionários da secretaria do Departamento de Zoologia, em especial a amiga Juliana.

A todos os funcionários e pós-graduandos do Departamento de Química e Bioquímica em especial aos amigos Renê, William Takata, Marizete, Luciana Borges, Luciana Manoel, Tatiane, Débora Prado, Raquel Cavasini e Sérgio.

A todos os funcionários do Laboratório de Produtos Naturais do IAC, em especial as queridas amigas que me auxiliaram nas análises dos óleos essenciais, Daniela, Roselaine e Mônica.

A todos os amigos do Laboratório de Mutagênese do Departamento de Patologia, em especial a Dr^a. Daisy Maria Favero Salvadori que me acolheu e sempre esteve de portas abertas para colaborar com o meu trabalho.

A todos os amigos da Pós-Graduação em Horticultura – FCA.

A todos os alunos de PIBIC Jr., em especial aos meus estagiários Andrielle e Felipe, com quem aprendi muito.

Ao amigo Ronaldo, que com todo seu profissionalismo e amizade, me ensinou a conviver mais pacificamente com as minhas inquietações e questionamentos sobre a vida.

Aos amigos Tereza e Leandro pelos longos anos de amizade e boas risadas.

Ao casal Maria Clara e Sílvio e as amigas Camila Braga e Aline Lima (Moranguinho) que abriram as portas de suas casas com todo amor para receber toda a minha família, sempre que eu solicitei. Vocês foram incríveis!

A todos os alunos e agregados da Pós-Graduação em Botânica, que dividiram comigo suas alegrias, medos e experiências. Agradeço em especial aos amigos: Alexandre, Ângelo, Amanda Amaro, Amanda Gobette, Carmen Cinira, Catarina, Cristiane, Débora Crocomo, Débora Klein, Débora Molizani, Daniel, Danilo, Ewerton, Fábio, Felipe, Fernanda, Juliana Cichinato, Juliana de Fazio, Lais, Larissa, Larisse, Leonardo, Luis Paulo, Luiz Ricardo,

Marcela, Márcia, Maria Izabela, Paula, Plácido, Priscila, Raquel Arruda, Renata, Roberto, Sabrina, Wilian Brambilla e Yve.

Aos meus irmãos, Ana Claudia, Angélica, Camila, Gabriela, Inara, Jaqueline, Jennifer, João Paulo, Juliana Iassia, Luciana Feliciano, Maria Carolina, Natália, Sérgio, Talita e Valter, que dividiram comigo os momentos mais felizes que tive durante todo o tempo do mestrado. Meus dias são muito mais coloridos ao lado de vocês...

Ao meu irmão Bruno Trevenzoli, que só agregou coisas incríveis a minha vida, me trazendo somente alegrias desde que eu o conheci.

Enfim, agradeço a todos os outros muitos amigos que direta, ou indiretamente, me ajudaram a concluir mais essa etapa da minha vida.

Com todo o meu amor,
Thaís Ribeiro Carboni *Bigú*

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
3. CAPÍTULO I – Análise de crescimento, trocas gasosas e potencial antioxidante de <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i> cultivado em solução nutritiva	20
4. CAPÍTULO II – Composição química do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i> cultivado em solução nutritiva	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS	57
8. APÊNDICES	61

CARBONI, T.R. ANÁLISE DE CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*. 2013. 67P Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Plantas de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* foram cultivadas em casa de vegetação, tipo Paddy-Fan, em solução nutritiva nº2 de Hoagland e Arnon (1950) 100% (completa), 75%, 50% e 25%. O objetivo do estudo foi avaliar o crescimento, trocas gasosas e potencial antioxidante de plantas da subespécie *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* submetidas a variação da concentração de nutrientes em solução nutritiva, bem como avaliar a influência desse fator na caracterização química do óleo essencial sintetizado por elas. Aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante das mudas para a solução nutritiva, a massa seca de folhas (MSF), massa seca total (MST) e as suas áreas foliares (AF) foram determinadas para a avaliação dos índices fisiológicos de razão de área foliar (RAF), razão de massa foliar (RMF), taxa assimilatória líquida (TAL) e taxa de crescimento relativo (TCR). As avaliações de trocas gasosas foram realizadas aos 20, 45 e 85 dias após o transplante. Aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante, amostras frescas da parte aérea das plantas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer*, para posterior realização das análises de pigmentos, flavonóides totais, fenóis totais, ácido ascórbico e potencial antioxidante (DPPH). O óleo essencial foi avaliado aos 60, 80 e 100 dias após o transplante. O experimento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, em esquema 4x5 (4 tratamentos e 5 épocas de colheita) para avaliação do crescimento e análises bioquímicas, 4x3 para as trocas gasosas e 3X3 para a análise da composição do óleo essencial. Os resultados obtidos sugerem que a variação da concentração da solução nutritiva pode estimular ou inibir o desenvolvimento de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*. As plantas cultivadas com soluções mais concentradas apresentaram diminuição de AF, MSF e MST, que interferiu com os índices fisiológicos. Além disso, revelaram diminuição das trocas gasosas e aumento de seu potencial antioxidante. Os compostos majoritários do OE, com exceção do germacreno D, apresentaram influência da concentração da solução nutritiva e da época de colheita ao longo do desenvolvimento da espécie. Os teores de sesquiterpenos tenderam a aumentar nas plantas cultivadas em soluções mais concentradas (100% e 75%). Esses resultados sugerem possível estresse causado pelo aumento dos nutrientes na solução nutritiva.

Palavras-chave: orégano; nutrição mineral; índices fisiológicos; terpenos; hidroponia.

CARBONI, T.R. 2013. **GROWTH ANALYSIS, EXCHANGE OF GASES, ANTIOXIDANT POTENTIAL AND ESSENTIAL OIL OF *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare***. 2013. 67P. Dissertation (Master's Degree) – Institute of Biosciences, UNESP – São Paulo State University, Botucatu Campus, São Paulo State, Brazil.

Origanum vulgare L. ssp. *vulgare* plants were grown in a Paddy-Fan greenhouse, with 100% (complete), 75%, 50%, and 25% Hoagland and Arnon (1950) #2 nutrient solution. The objective of the study was to evaluate the influence of the complete nutrient solution with the various diluted solutions, with regards to the growth of the *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, its gas exchange, antioxidant potential, and chemical composition during its growth. At 20, 40, 60, 80 and 100 days after transplanting the seedlings to the nutrient solution the following observations were measured: dry matter of leaves (DML) and total (DMT), and leaf area of the leaves (AL). These measurements were used to evaluate the physiological index, leaf area ratio (LAR), leaf weight ratio (LWR), net assimilation rate (NAR), and relative growth rate (RGR). The exchange of gases was evaluated at 20, 45 and 85 days after transplantation. At 20, 40, 60, 80 and 100 days after transplantation, fresh samples of foliage were collected and frozen in liquid nitrogen. These samples were stored in a freezer for later analyzes of pigmentation, total flavonoids, total phenols, ascorbic acid, and antioxidant potential. The essential oil was evaluated at 60, 80 and 100 days after transplantation. The experiment was randomized with the following factors: four repetitions in a design 4x5 (4 treatments and 5 harvest timeframe) to evaluate the growth and biochemical results, 4x3 for exchange of gases and 3X3 for the analysis of essential oil composition. The results of this experiment indicates that the variation of the nutrient solution's concentration can stimulate or inhibit the growth *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, particularly in more concentrated solutions. Plants grown with more concentrated solutions showed a decrease of DML, DMT and AL, which interfered with the physiological indices. Additionally, a reduction in the exchange of gases was present, as well as an increase in the antioxidant potential. The major compounds of essential oil, with the exception of germacrene D, were shown to be influenced by the nutrient solution concentration, as well as the harvest timeframe, throughout the development of the species. The percentage of sesquiterpenes tended to increase in plants cultivated in more concentrated solutions (100% and 75%). These results suggest a possible stress caused by the increase of nutrients.

Keywords: oregano, mineral nutrition, physiological index; terpenes; hydroponics.

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são amplamente utilizadas por possuírem particularidades químicas que produzem efeitos terapêuticos no organismo, o que justifica o crescente interesse por seu cultivo, visando o aumento do teor dessas substâncias (LOVKOVA et al., 2001).

A família Lamiaceae é rica em espécies aromáticas (SOUZA e LORENZI, 2012) conhecidas por apresentarem atividades farmacológicas. Desde a antiguidade são utilizadas como especiarias culinárias, como forma de valorizar as propriedades organolépticas dos alimentos (BOZIN et al., 2006), como medicamentos naturais, devido às suas propriedades antimicrobianas (DORMAN e DEANS, 2000; VIUDA-MARTOS et al., 2008) e como alternativa ao uso de produtos químicos sintéticos, na agricultura (ANTUNES e CAVACO, 2010).

Embora há muitas gerações o homem utilize essas plantas, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na produção de seus metabólitos, cujas características podem ser importantes para garantir culturas mais produtivas e com maior resistência ao estresse (FIGUEIREDO e MIGUEL, 2010).

Dentre os principais metabólitos sintetizados pelas plantas estão os óleos essenciais, definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, geralmente produzidos em resposta a herbivoria (LOVKOVA et al., 2001; BAKKALI, et al., 2008). Sua composição química não apresenta estabilidade, estando sua produção intimamente ligada à exposição da planta a fatores ambientais, o que reflete seu valor comercial (KANIAS et al, 1998).

Entre as espécies aromáticas mais conhecidas está o orégano (*Origanum vulgare* L.), nativo de regiões montanhosas do sul da Europa e cultivado no Brasil como especiaria de uso na culinária. A planta é empregada na medicina caseira e seu óleo é utilizado na composição de aromatizantes de alimentos e perfumes (LORENZI e MATOS, 2002).

Estudos sobre o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, subespécie bastante difundida na Itália (IETSWAART, 1980), descrevem os compostos germacreno D, β -ocimeno, β -cariofileno e sabineno como majoritários (MOCKUTE et al., 2001; MOCKUTE et al., 2003). No entanto, poucos trabalhos avaliam as respostas fisiológicas dessa subespécie

de orégano frente a fatores abióticos, como por exemplo, a época de colheita do material vegetal utilizado para a avaliação do óleo e a quantidade de nutrientes disponíveis no solo.

Excesso ou falta de nutrientes pode gerar desequilíbrio para a planta (GRATTAN e GRIEVE, 1999) e contra os radicais livres que podem ser produzidos nessa condição, devem ser consideradas as defesas antioxidantes, destacando-se ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides e compostos fenólicos, dentre os quais, os flavonóides (VALKO et al., 2007).

A eficácia da ação antioxidante desses componentes depende de sua concentração no vegetal, que além dos fatores genéticos, são influenciados pelas condições do ambiente, entre as quais, a nutrição mineral, como verificado em hortaliças (KAHKONEN et al., 1999; MELO et al., 2006).

Além disso, o crescimento das plantas e sua produção também podem ser afetados pela concentração de elementos minerais disponibilizados, pois o processo de absorção de íons pelas raízes está intimamente ligado ao equilíbrio entre fotossíntese e respiração (HUNT, 2003). O uso da análise de crescimento como ferramenta para avaliar o crescimento e inferir a contribuição de diferentes processos fisiológicos sobre o comportamento vegetal é forma de estudo acessível, pois utiliza variáveis de simples obtenção para a sua realização (BENINCASA, 2003), como a massa seca e a área foliar das plantas. A utilização de sistemas de fluxo aberto de trocas gasosas como o IRGA (*Infra-Red Gas Analysis*) pode complementar a avaliação, tornando as medições pontuais desses processos mais rápidas e precisas (HUNT, 2003).

Dessa forma, a avaliação das condições nutricionais a que as plantas medicinais e aromáticas são submetidas durante o seu cultivo e a expressão de seu potencial antioxidante podem ser importantes para o conhecimento da fisiologia da espécie, auxiliando trabalhos futuros que levem ao desenvolvimento de alimentos funcionais ou possíveis terapias para a prevenção de doenças.

Com base no exposto acima, o presente estudo objetivou avaliar o crescimento, trocas gasosas e potencial antioxidante de plantas da subespécie *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* submetidas a variação da concentração de nutrientes em solução nutritiva, bem como avaliar a influência desse fator na caracterização química do óleo essencial sintetizado por elas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Para assegurar sua sobrevivência no meio, as plantas necessitam de diferentes formas de proteção, já que não podem deslocar-se para evitar ataque de possíveis agressores (NEILSON et al., 2013).

Durante anos a pressão da seleção natural sobre as plantas resultou em mudanças evolutivas na sua estrutura genética e expressão gênica, propiciando a formação de novas rotas biossintéticas, cuja principal função é a síntese de compostos químicos (SCHWAB, 2003) que tem como principal finalidade inibir a ação de microorganismos patógenos e herbívoros (COLEY et al., 1985). Dessa forma, a produção e característica química desses compostos foi selecionada ao longo da evolução, de forma a suprir necessidades específicas de grupos restritos de plantas (PICHERSKY e GANG, 2000).

A produção desses metabólitos, conhecidos como secundários, está intimamente ligada ao metabolismo primário das plantas, cujas vias metabólicas promovem os processos fisiológicos comuns a todas as espécies vegetais, entre eles, fotossíntese, respiração e transporte de solutos (AHARONI e GALILI, 2011).

Os metabólitos secundários são produzidos em rotas distintas, sendo divididos em três grupos, compreendidos pelos terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Os terpenos são formados a partir da combinação de unidades isoprênicas, compostas por cadeias de cinco carbonos (C5) e sua biossíntese consiste na produção do precursor geranyl difosfato (GPP) pela condensação do isopentenil difosfato (IPP), formado a partir da rota do ácido mevalônico no citosol, e do dimetialil difosfato (DMAPP), formado a partir da rota do metileritritol fosfato (MEP) no cloroplasto. A contribuição dessas vias para o produto final pode ser diferente entre as espécies de plantas, embora os principais compostos produzidos sejam os monoterpenos, formados a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno (C10), e os sesquiterpenos, formados a partir do conjunto de três unidades de isopreno (C15) (LANGE e AHKAMI, 2013).

Monoterpenos são responsáveis pelas propriedades organolépticas associadas às plantas aromáticas (DAVIS, 2010). Os sesquiterpenos apresentam como característica grande variedade de estruturas, que resultam das inúmeras possibilidades de ciclizações devido à

extensão de sua cadeia carbônica. A estrutura e função dos sesquiterpenos são similares àquelas dos monoterpenos (BAKKALI et al., 2008).

As misturas complexas de monoterpenos, sesquiterpenos e alguns outros compostos voláteis, sintetizadas pelas plantas aromáticas, são conhecidas como óleos essenciais (OEs) (BAKKALI et al., 2008), e nas últimas décadas, o estudo desses OEs levou a descoberta de novos compostos e a melhor elucidação da diversidade que envolve esses produtos naturais (FRANZ et al., 2010).

Os OEs apresentam concentrações diferentes de seus vários componentes, sendo dois ou três majoritários, o que geralmente determina as suas propriedades biológicas. São amplamente utilizados como matéria-prima na indústria de alimentos, farmacêutica e agrícola, pois ao contrário dos compostos sintéticos, os OEs geralmente são desprovidos de riscos genotóxicos em longo prazo, podendo apresentar capacidade antimutagênica que pode estar ligada a atividades anticarcinogênicas (BAKKALI et al., 2008).

Em espécies de plantas aromáticas, esses OEs são produzidos por células especializadas em sintetizar, armazenar e secretar tipos variados de metabólitos, conhecidas como tricomas glandulares, que se projetam da epiderme e agem como advertência, repelindo potenciais herbívoros, mesmo antes que ataquem a planta (TAIZ e ZEIGER, 2009). Tais tricomas, presentes principalmente na superfície das folhas, podem variar em tamanho, número e morfologia, e atualmente, são alvo de estudos que visam aproveitar sua maquinaria celular para a produção de compostos de interesse específico (SCHILMILLER et al., 2008).

Plantas da família Lamiaceae, pertencente a ordem Lamiales (APG III, 2009), possuem cerca de 300 gêneros e 7.500 espécies, muitas aromáticas como a lavanda (*Lavandula angustifolia*), a erva-cidreira (*Melissa officinalis*), o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e o orégano (*Origanum vulgare*) (SOUZA e LORENZI, 2012). Embora há muitas gerações o homem utilize essas plantas, pouco se sabe sobre os mecanismos reais envolvidos na produção de seus metabólitos, cujas informações são importantes para garantir a produção de culturas mais produtivas e mais resistentes ao estresse (FIGUEIREDO, 2010).

O orégano (*Origanum vulgare* L.) está entre as espécies aromáticas mais conhecidas. Segundo Ietswaart (1980), na espécie se distinguem seis subespécies, sendo elas, *gracile* (Kock) Ietswaart, *glandulosum* (Desfontaines) Ietswaart, *hirtum* (Link) Ietswaart, *vulgare* L., *virens* (Hoffmannsegg et Link) Ietswaart and *viride* (Boissier) Hayek. No entanto, de acordo com Kokkini e Vokou (1989), a taxonomia da espécie *Origanum vulgare* ainda é difícil de ser

compreendida e mesmo depois da revisão do gênero por Ietswaart, alguma confusão ainda persiste (KANIAS, 1998).

Tradicionalmente a análise taxonômica das plantas aromáticas foi baseada em características morfológicas, e hoje, dada a importância da composição dos metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, a quimiotaxonomia deve ser considerada, podendo auxiliar a sistemática e filogenia das plantas (TRINDADE, 2010).

D'Antuono et al. (2000) questionam a utilização exclusiva de características morfológicas para a identificação das plantas, pois seus estudos com populações nativas de *O. vulgare* apresentaram plantas com características morfológicas referentes a subespécie *viride*, embora o teor e a composição química do OE apresentassem resultados compatíveis com outras subespécies. Dessa forma, a dificuldade de relacionar o teor e a composição química do OE das amostras estudadas com suas particularidades morfológicas sugeriu que a taxonomia de *O. vulgare* fosse estudada com base em seu OE para auxiliar a identificação das subespécies.

Kanias et al. (1998) em seu estudo com *O. vulgare* registraram que a subespécie não havia sido identificada, e portanto, apresenta os resultados sem considerar as diferentes subespécies. No entanto, a maioria dos trabalhos não identificam a subespécie e não apresentam referências as possíveis diferenças entre elas na composição de seus OEs.

Mais minucioso foi o estudo de Mockute et al. (2003), que além de definir a subespécie com que trabalharam, ainda separaram a parte aérea das plantas em parte vegetativa e reprodutiva para a determinação da composição química dos OEs, ao contrário de outros trabalhos que utilizaram a parte aérea sem discriminar se usaram ou não as inflorescências, o que neste caso, também remeteu a diferentes resultados.

A condução dos estudos com OEs é dificultada pela instabilidade de seus compostos voláteis e muitas vezes são observadas diferenças nos seus teores em plantas da mesma espécie, devido às condições ambientais locais, variações geográficas e nutrição mineral (KOKKINI et al., 1994; FIGUEIREDO, 2010).

Cada espécie apresenta exigência nutricional diferente que interfere em seu desenvolvimento (MALAVOLTA, 2006) e apesar disso, a influência da nutrição sobre o desenvolvimento da subespécie *vulgare* é pouco relatada. Dessa forma, a variação da concentração dos elementos essenciais presentes na nutrição das espécies pode interferir em

seu metabolismo primário, o que pode influenciar também o secundário, cujas rotas metabólicas dependem do primeiro.

Nos últimos anos ocorreram avanços na compreensão da regulação dos fluxos metabólicos entre o metabolismo primário e secundário em plantas. Por sintetizarem uma infinidade de compostos secundários, as plantas passaram a atrair grande interesse científico em estudos que visam manipular essa interface, podendo dessa forma interferir com a produção desses compostos naturais (AHORONI e GALILI, 2011).

Para avaliar os elementos minerais e as suas concentrações no desenvolvimento das espécies, a hidroponia é uma importante ferramenta (RESH, 1995). Além disso, as plantas medicinais apresentam maior produtividade, acumulando mais OEs por área, quando cultivadas em soluções nutritivas (MAIRAPETYAN, 1999).

O cultivo hidropônico em casa de vegetação apresenta como vantagens maior rendimento por área e melhor qualidade do produto, menor incidência de pragas e doenças e maior facilidade de execução dos tratos culturais em decorrência do maior controle ambiental, já que no solo, a interdependência entre os fatores da interface solo/raiz é maior. Como vantagem adicional, pode-se ter melhor controle do ambiente também para a parte aérea, o que reduz o erro experimental e leva a menores coeficientes de variação (MARTINEZ, 2002).

Embora as plantas possuam a capacidade de se adaptar a diferentes concentrações de nutrientes, já que naturalmente podem se desenvolver em solos de natureza variada, cada espécie apresenta exigência nutricional diferente. Dessa forma, não existe solução nutritiva que atenda as necessidades específicas de todas as espécies vegetais (HOAGLAND e ARNON, 1950).

Todas as plantas dependem da disponibilidade de nutrientes, luz e água para o seu crescimento (COLEY et al., 1985). Mesmo sendo fornecidas as condições ideais, a concentração adequada da solução pode variar com o crescimento. A troca constante dessa solução manterá a disposição das raízes os íons e a água, cuja diminuição de volume leva a variação do pH e precipitação de certos elementos, tornando-os indisponíveis (HOAGLAND e ARNON, 1950).

A fotossíntese e a respiração são os processos fisiológicos mais estudados na área vegetal, e isso pode ser claramente compreendido, pois de forma geral, o equilíbrio entre esses dois processos é o que determina o crescimento e a produção da maioria das espécies vegetais (HUNT, 2003). Nesse contexto, os elementos minerais devem ser considerados.

O uso da análise de crescimento como ferramenta para avaliar o crescimento e inferir a contribuição de diferentes processos fisiológicos sobre o comportamento vegetal ainda é uma forma de estudo precisa e acessível, pois utiliza variáveis relativamente fáceis de serem obtidas (BENINCASA, 2003).

Grandes avanços na área de microeletrônica levaram ao desenvolvimento de aparelhos complexos, como o IRGA (*Infra-Red Gas Analyser*), para mensurar os processos fisiológicos de fotossíntese e respiração, ao mesmo tempo em que avanços na área de processamento digital de dados simplificaram esses sistemas, tornando as medições desses processos mais rápidas e precisas (HUNT, 2003).

A clorofila *a* é o principal pigmento envolvido com a fotossíntese (RAVEN, 2007) e o aumento dos seus teores leva ao aumento da taxa fotossintética das plantas, como relatado por Locarno et al. (2011) no cultivo de rosas em solução nutritiva com variação dos níveis de silício.

Os carotenóides protegem os organismos fotossintéticos de processos oxidativos, desempenhando papéis fundamentais, como pigmentos acessórios para a fotossíntese, assim como a clorofila *b*, absorvendo a luz de regiões do espectro que não é absorvida pelas clorofilas (BARTLEY e SCOLNIK, 1995).

Os resultados obtidos por meio da análise de crescimento, aliados aos dados pontuais de trocas gasosas, teores de clorofila *a* e *b* e carotenóides, podem trazer informações importantes para a interpretação do crescimento da espécie em relação as diferentes concentrações das soluções nutritivas a que foram submetidas.

Fatores ambientais podem interferir na qualidade das culturas e desequilíbrios podem gerar estresses, causando danos oxidativos, por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que funcionam como moléculas de sinalização em plantas envolvidas na regulação de respostas de defesa (APEL e HIRT, 2004).

Essas moléculas de sinalização, de forma geral, estimulam o aumento da concentração de compostos antioxidantes de defesa, embora, por outro lado, o estresse causado também leva a deterioração do vegetal, alterando suas características físicas e sensoriais (WANG e FREI, 2001).

O desequilíbrio gerado pelo excesso ou falta de nutrientes (GRATTAN e GRIEVE, 1999) produz radicais livres e contra eles, encontram-se as defesas antioxidantes, destacando-

se o ácido ascórbico (vitamina C), os carotenóides e os compostos fenólicos, entre os quais, os flavonóides (VALKO et al., 2007).

O ensaio DPPH foi proposto por Brand-Williams et al. (1995) e foi baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por compostos antioxidantes, produzindo um decréscimo na leitura de sua absorbância. Esse teste é amplamente utilizado em amostras de material vegetal para avaliar o efeito da eliminação de radicais livres. Como radical livre, o DPPH tem uma banda de absorção na região do visível a 517 nm, perdendo essa propriedade quando protonado por um composto antioxidante.

A medição de um composto antioxidante pode não explicar completamente as propriedades antioxidantes de um extrato vegetal. Outros compostos, não necessariamente envolvidas naquela ação antioxidante, também devem ser considerados (SCALZO, 2008).

Conhecidos como antioxidantes, o ácido ascórbico (vitamina C) apresenta várias funções nas plantas, sendo mais conhecido como antioxidante a produtos reativos do metabolismo de oxigênio, como por exemplo, radical superóxido e o peróxido de hidrogênio (VELIŠEK, 2002). Os compostos fenólicos, são relacionados como retardadores da degradação oxidativa dos lípidos, melhorando assim, a qualidade e valor nutricional dos vegetais (LOLIGER, 1991).

Entre os mais conhecidos compostos fenólicos estão os flavonóides, importantes na pigmentação de flores, frutas e folhas, principalmente pela ação das antocianinas, e no crescimento e desenvolvimento das plantas, protegendo-as contra possíveis infecções e lesões (GHARRAS, 2009).

A eficácia da ação antioxidante dos componentes bioativos depende da estrutura química e da sua concentração no vegetal. O teor de fitoquímicos em hortaliças, por exemplo, é influenciado por fatores genéticos e condições ambientais (KAHKONEN et al., 1999; MELO et al., 2006), entre as quais deve ser considerada a nutrição mineral na qual a espécie foi cultivada.

Assim, a relação entre as condições nutricionais a que as espécies são submetidas durante o seu cultivo e a síntese de antioxidantes nas suas folhas, pode trazer informações importantes que levem ao desenvolvimento de alimentos funcionais ou possíveis terapias para a prevenção de doenças.

O entendimento dessas vias biossintéticas, nos leva ao estudo de novas possibilidades para o cultivo de vegetais com compostos (nutracêuticos), contribuindo com a melhora da saúde humana (DIXON e ARNTZEN, 1997).

CAPÍTULO I

**Análise de crescimento, trocas gasosas e potencial antioxidante de
Origanum vulgare L. ssp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva**

Artigo elaborado nas normas da revista Brazilian Journal of Plant Physiology

Análise de crescimento, trocas gasosas e potencial antioxidante de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva

Thaís Ribeiro Carboni^{1*}, Jennifer Búfalo¹, Ana Claudia Macedo², Amanda Amaro², Marizete Cavalcante³, João Domingos Rodrigues¹, Giuseppina Pace Pereira Lima³ e Carmen Sílvia Fernandes Boaro¹

¹ Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, Brasil

² Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, Brasil

³ Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, Brasil

RESUMO

Plantas de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* foram cultivadas em casa de vegetação, tipo Paddy-Fan, em solução nutritiva nº2 de Hoagland e Arnon (1950) 100% (completa), 75%, 50% e 25%. O objetivo do estudo foi avaliar a influência da solução nutritiva completa e diluída no crescimento, trocas gasosas e potencial antioxidante da subespécie durante o seu desenvolvimento. Aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante das mudas para a solução nutritiva, as massas secas de folhas e total das plantas e as suas áreas foliares foram determinadas para a avaliação dos índices fisiológicos, razão de área foliar (RAF), razão de massa foliar (RMF), taxa assimilatória líquida (TAL) e taxa de crescimento relativo (TCR). Nas mesmas épocas, amostras frescas da parte aérea das plantas foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas em *freezer* para a realização das análises de pigmentos, flavonóides totais, fenóis totais, ácido ascórbico e potencial antioxidante (DPPH). As avaliações de trocas gasosas foram realizadas aos 20, 45 e 85 dias após o transplante. O experimento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema 4x5 (4 tratamentos e 5 épocas de colheita) para avaliação do crescimento das plantas e análises bioquímicas e 4x3, para as trocas gasosas. Os resultados obtidos sugerem que a variação na concentração da solução nutritiva pode estimular ou inibir o desenvolvimento de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, interferindo no seu crescimento, trocas gasosas e potencial antioxidante.

Palavras chave: orégano, hidroponia, assimilação de CO₂, DPPH, compostos fenólicos

ABSTRACT

Origanum vulgare L. ssp. *vulgare* plants were grown in a Paddy-Fan greenhouse, with 100% (complete), 75%, 50%, and 25% Hoagland and Arnon (1950) #2 nutrient solution. The objective of the study was to evaluate the influence of the complete nutrient solution with the various diluted solutions, with regards to the growth of the *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, its gas exchange and antioxidant potential. At 20, 40, 60, 80 and 100 days after transplanting the seedlings to the nutrient solution the following observations were measured: dry matter of leaves (DML) and total (DMT), and leaf area of the leaves (AL). These measurements were used to evaluate the physiological index, leaf area ratio (LAR), leaf weight ratio (LWR), net assimilation rate (NAR), and relative growth rate (RGR). The exchange of gases was evaluated at 20, 45 and 85 days after transplantation. At 20, 40, 60, 80 and 100 days after transplantation, fresh samples of foliage were collected and frozen in liquid nitrogen. These samples were stored in a freezer for later analyzes of pigmentation, total flavonoids, total phenols, ascorbic acid, and antioxidant potential. The experiment was randomized with the following factors: four repetitions in a design 4x5 (4 treatments and 5 harvest timeframe) to evaluate the growth and biochemical results, 4x3 for exchange of gases. The results of this experiment indicates that the variation of the nutrient solution's concentration can stimulate or inhibit the growth of the *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, interfering in its growth rate, exchange of gases and antioxidant potential.

Keywords: oregano, hydroponics, CO₂ assimilation, DPPH, phenolic.

INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae é rica em espécies de plantas aromáticas (Souza e Lorenzi, 2012), conhecidas por apresentarem atividades biológicas e farmacológicas. Desde a antiguidade espécies da família são utilizadas como especiarias culinárias (Bozin, 2006), medicamentos naturais, devido às suas propriedades antimicrobianas (Dorman, 2000; Viuda-Martos et al., 2008) e como alternativa aos produtos químicos sintéticos, na agricultura (Antunes e Cavaco, 2010).

Embora há muitas gerações o homem utilize essas plantas, pouco se sabe sobre os mecanismos reais envolvidos na produção de seus metabólitos, cujas informações são importantes para garantir a produção de culturas mais produtivas, de maior valor nutritivo e mais resistentes ao estresse (Figueiredo e Miguel, 2010).

O orégano (*Origanum vulgare* L.) está entre as espécies aromáticas mais conhecidas. Segundo Ietswaart (1980), na espécie se distinguem seis subespécies, sendo elas, *gracile* (Kock) Ietswaart, *glandulosum* (Desfontaines) Ietswaart, *hirtum* (Link) Ietswaart, *vulgare* L., *virens* (Hoffmannsegg et Link) Ietswaart and *viride* (Boissier) Hayek.

Estudos da composição química dos óleos essenciais da subespécie *vulgare* revelam principalmente germacreno D, β -ocimeno, β -cariofileno e sabineno, como compostos majoritários (Mockute et al., 2001; Mockute et al., 2003). Esses estudos, no entanto, não avaliam as respostas fisiológicas da subespécie frente a fatores ambientais, ao longo do seu desenvolvimento.

O crescimento e produção da maioria das espécies vegetais está intimamente ligada aos processos de fotossíntese e respiração, que dependem da absorção de íons do solo (Le Bot, 1998). O equilíbrio entre esses processos estabelece o resultado final da avaliação de crescimento e produção (Hunt, 2003).

O uso da análise de crescimento como ferramenta para avaliar o crescimento e inferir a contribuição de diferentes processos fisiológicos sobre o comportamento vegetal é forma de estudo acessível, pois utiliza variáveis de simples obtenção para a sua realização (Benincasa, 2003), como a massa seca e a área foliar das plantas. A utilização de sistemas de fluxo aberto de trocas gasosas como o IRGA (*Infra-Red Gas Analysis*), pode complementar a avaliação, tornando as medições pontuais desses processos mais rápidas e precisas (Hunt, 2003).

Excesso ou falta de nutrientes pode gerar desequilíbrio para a planta (Grattan e Grieve, 1999) e contra os radicais livres que podem ser produzidos nessa condição, com forte possibilidade de indução de estresse oxidativo, estão as defesas antioxidantes, destacando-se entre as mais expressivas, ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides, e compostos fenólicos, dentre os quais, os flavonóides (Valko et al., 2007).

A eficácia da ação antioxidante dos componentes bioativos depende sua concentração e estrutura química. Além dos fatores genéticos, condições do ambiente, entre as quais, a nutrição mineral, pode influenciar o teor de fitoquímicos, como verificado em hortaliças (Kahkonen et al., 1999; Melo et al., 2006).

Dessa forma, a avaliação das condições nutricionais a que as plantas medicinais e aromáticas são submetidas durante o seu cultivo e a expressão de seu potencial antioxidante

podem ser importantes para o conhecimento da fisiologia da espécie, auxiliando trabalhos futuros que levem ao desenvolvimento de alimentos funcionais ou possíveis terapias para a prevenção de doenças.

O objetivo do estudo foi avaliar a influência da solução nutritiva completa e diluída no crescimento, trocas gasosas e potencial antioxidante da subespécie *vulgare* durante o seu desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e delineamento experimental: o experimento foi conduzido no período de abril a setembro de 2011, no Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu/SP (48°24'35'' W, 22°49'10'' S), a 800 m acima do nível do mar. Estacas de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* foram obtidas de plantas matrizes cultivadas a partir de sementes comerciais (Topseed Garden®, da linha Blue Line). A seguir, essas estacas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno expandido com substrato comercial Rendmax® e mantidas em câmara de nebulização intermitente, até o enraizamento. Após 40 dias, as plantas foram transferidas das bandejas para vasos de polietileno com capacidade igual a seis litros, contendo solução nutritiva nº2 de Hoagland e Arnon (1950) 100% (completa), 75%, 50% e 25% e mantidos em casa de vegetação, tipo Paddy-Fan. O pH e a condutividade elétrica da solução nutritiva foram avaliados durante todo o experimento e mantidos entre 6,0 e 6,5 e 1,5 e 2,5 mS cm⁻¹, respectivamente. A solução foi continuamente arejada por meio de soprador rotativo e renovada sempre que esses índices apresentaram alteração. Sempre que necessário, o volume da solução nos vasos foi completado com água deionizada. O experimento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial 4x5 para avaliação do crescimento das plantas e dos teores de pigmentos, flavonóides totais, fenóis totais, ácido ascórbico e potencial antioxidante (DPPH) e 4x3, para as trocas gasosas.

Análise dos índices fisiológicos do crescimento vegetal: as plantas foram colhidas aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante (DAT) para a solução nutritiva. Raízes, caules e folhas foram separados e com auxílio de um integralizador de área foliar, modelo LI 3100 da LI-COR, determinou-se a área foliar das lâminas foliares, em dm². A seguir todos os órgãos foram acondicionados separadamente em sacos de papel identificados e colocados em estufa com circulação forçada de ar, em temperatura de 40°C, até obtenção de massa constante.

Após a secagem completa, a massa seca foi determinada em balança analítica Ohaus tipo Analytical Standard, com sensibilidade de até 0,1 mg. Área foliar (AF), massa seca de folhas (MSF) e massa seca total (MST) foram ajustadas em relação ao tempo, segundo a equação exponencial quadrática para se proceder a estimativa dos índices fisiológicos, de razão de área foliar (RAF), razão de massa foliar (RMF), taxa assimilatória líquida (TAL) e taxa de crescimento relativo (TCR), segundo Portes e Castro Júnior (1991).

Avaliação das trocas gasosas: as avaliações foram realizadas utilizando-se equipamento com sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO₂ e vapor d'água por radiação infravermelha (“Infra Red Gas Analyser – IRGA”, modelo LI-6400, LI-COR). As medidas foram calculadas a partir da diferença entre a concentração de CO₂ e o vapor d'água do ar de referência (valor presente na câmara sem a folha) e da amostra (valor com a folha presente na câmara), obtendo-se as concentrações de vapor d'água e CO₂ que foram liberados (transpiração – vapor d'água) e assimilados (assimilação de CO₂) através dos estômatos das folhas. As características analisadas foram: taxa de assimilação de CO₂ (*A*), taxa de transpiração (*E*), condutância estomática (*g_s*) e concentração interna de CO₂ (*C_i*) na folha. Essas características foram calculadas pelo programa de análise de dados do equipamento medidor de trocas gasosas, que utiliza a equação geral de trocas gasosas de Von Caemmerer e Farquhar (1981). A eficiência do uso da água foi determinada pela da relação entre a assimilação de CO₂ e a taxa de transpiração (*A/E*), e a eficiência de carboxilação foi determinada pela relação entre a taxa de assimilação de CO₂ e a concentração interna de CO₂ na folha (*A/C_i*). As medidas foram realizadas aos 20, 45 e 85 dias após o transplante, totalizando três avaliações, selecionando-se duas plantas de cada tratamento, nas quais foram escolhidas e padronizadas a 6ª folha com limbo totalmente expandido.

Potencial antioxidante - DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila): para determinação foi utilizada a metodologia de Brand-Williams et al (1995) modificada por Rosseto et al (2009). A solução de DPPH foi preparada a $2,10^{-4}$ g mL⁻¹ (0,0100 mg de DPPH em 50 mL de etanol a 99,8%). Para a extração foram pesados 0,1 g da amostra fresca e diluídas em 10 mL de etanol a 99,8% em tubo para centrífuga. As amostras foram centrifugadas a 2.000 x g (HETTICH ZENTRIFUGEN MIKRO 220R) por 10 minutos a 5°C. Aliquota de 0,500 µL do sobrenadante foi adicionada a 3 mL de etanol P.A. Adicionados 300 µL de DPPH 2×10^{-4} g.mL⁻¹, após a homogeneização, os tubos de ensaios foram armazenados no escuro por 60

minutos. Um controle negativo foi realizado com o DPPH a 0,3mM em etanol. A leitura obtida a 517 nm foi convertida em porcentagem de atividade antioxidante pela fórmula:

$$\% DPPH \text{ reduzido} = \left(\frac{Abs \text{ Branco} - Abs \text{ Amostra}}{Abs \text{ Branco}} \right) \cdot 100$$

Uma curva de calibração foi preparada com 20, 40, 60, 80 e 100 μmol de Trolox e os resultados expressos em μM equivalentes de TROLOX / mg/g^{-1} amostra (TEAC).

Teores de pigmentos: a extração dos carotenóides totais foi realizada utilizando matéria fresca, segundo o método validado por Sims e Gamon (2002). Os pigmentos analisados foram clorofilas, antocianinas e carotenóides em solução tamponada de acetona e também em metanol. A quantidade de material foi adaptada de acordo com as características do vegetal. As amostras trituradas e pesadas, foram homogeneizadas em mini-turrax (MARCONI) com 3 mL de uma solução gelada de acetona/Tris-HCl (80:20, v:v, pH 7,8 0,2M), durante um minuto. A extração foi conduzida em gelo e protegida da luz. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi imediatamente conduzido para leitura em espectrofotômetro UV/VIS (Amersham-Pharmacia-Biotech) na região do visível a 663 (clorofila a), 647 (clorofila b), 537 (antocianina) e 470 (carotenóides) nanômetros. Os valores de absorvância foram convertidos em μg de carotenóides totais. g^{-1} com base nas fórmulas deduzidas pelos autores: Carotenóides ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$) = $\{A_{470} - [17,1.(Cl_a + Cl_b)] - 9,479.\text{antocianina}\} / 119,26$. Clorofila a ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$) = $0,01373(A_{663}) - 0,000897(A_{537}) - 0,003046(A_{647})$. Clorofila b ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$) = $0,02405(A_{647}) - 0,004305(A_{537}) - 0,005507(A_{663})$.

Teor de fenóis totais: a análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico com o uso do reagente de Folin-Ciocalteu (Rossi Jr., 1965; Singleton et al., 1999). Amostras do material seco e moído foram pesadas e colocadas em tubos de centrífuga, contendo acetona 50%. Em seguida foram levados para banho ultrassônico por 20 minutos e posteriormente centrifugados a 6.000 x g (HETTICH ZENTRIFUGEN MIKRO 220R) durante 10 minutos, depois do que o sobrenadante foi recolhido. O precipitado foi re-extraído e os sobrenadantes combinados. Aliquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram transferidas para tubos de ensaio, juntamente com 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de solução saturada de Na_2CO_3 . Após 1 hora de reação (completa precipitação do carbonato) a leitura de absorvância

foi realizada a 725 nm (PHARMACIA BIOTECH ULTROSPEC 2000) e os resultados expressos em $\mu\text{g fenóis g}^{-1}$ massa seca, em equivalente de ácido gálico.

Teor de flavonóides totais: a extração foi realizada de acordo com o método de Awad et al. (2000), segundo as adaptações realizadas por Popova et al (2004). Amostras de material fresco foram maceradas em nitrogênio líquido e pesadas em balança analítica. Metanol acidificado 10% foi adicionado às amostras, que posteriormente foram levadas ao banho ultrassônico durante 30 minutos e com adição de cloreto de alumínio 5% foram centrifugadas por 20 minutos a 10000 x g (JOUAN MR 18 12). Em seguida, as amostras foram filtradas e a leitura de absorbância realizada a 425 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g flavonóides g}^{-1}$ massa fresca, em equivalente de quercetina.

Teor de ácido ascórbico: a determinação foi realizada pelo método de Tillmans, por titulometria, baseando-se na redução do corante 2,6 diclorofenol-indofenol pelo ácido ascórbico. O ácido ascórbico foi colocado para reagir com o indicador oxidado 2,6 diclorofenol-indofenol de forma a produzir um composto incolor (IAL, 2005).

RESULTADOS

Concentração da solução nutritiva no crescimento das plantas: as plantas cultivadas nas soluções nutritivas com diferentes concentrações apresentaram respostas semelhantes quando se avaliou a AF, MSF e MST (Figura 1). De maneira geral, os valores mais baixos foram revelados pelas plantas cultivadas com solução 100%, os intermediários pelas submetidas à solução 75% e os mais elevados pelas plantas cultivadas em solução 50% e 25%. Deve ser registrado o aumento contínuo de AF, MSF e MST das plantas cultivadas com solução 100% até os 100 DAT, estabilização nas cultivadas com solução 75% dos 80 aos 100 DAT e, de modo geral, no mesmo período, tendência de queda dessas variáveis nas plantas cultivadas em solução 25% e 50%.

Concentração da solução nutritiva nos índices fisiológicos da análise de crescimento: RAF, a TAL, a TCR e a RMF tenderam ao decréscimo durante o todo o desenvolvimento, com exceção das plantas cultivadas em solução nutritiva completa, em que esses índices revelaram-se mais constantes. Nessas curvas, decréscimos mais acentuados foram verificados

para as plantas cultivadas com as menores concentrações de soluções nutritivas (25% e 50%) (Figura 2).

Concentração da solução nutritiva nas trocas gasosas: as plantas cultivadas em solução 25% e 50% apresentaram maior assimilação de CO₂ (*A*) aos 20 e 45 DAT. Aos 85 DAT, a assimilação de CO₂ diminuiu, tornando-se mais próxima a das demais plantas (Figura 3-A). Resultados semelhantes foram verificados para a condutância estomática (*g_s*) (Figura 3-B). De maneira geral, as plantas cultivadas com as soluções mais diluídas apresentaram as maiores concentrações internas de CO₂ (*C_i*) e transpiração (Figuras 3-C e 3-D). Aumento da eficiência de carboxilação (*A/C_i*) ocorreu principalmente aos 20 DAT, nas plantas cultivadas em solução 50%, e aos 45 e 85 DAT naquelas cultivadas em solução completa (Figura 3-E). Destaca-se aumento da eficiência do uso da água (*A/E*) aos 85 DAT nas plantas cultivadas em solução nutritiva completa e o equilíbrio dessa variável que as plantas dos diferentes tratamentos mantiveram durante as três avaliações (Figura 3-F).

Concentração da solução nutritiva nos teores de Clorofila *a*: plantas cultivadas em solução 50% e 75% revelaram os maiores teores de clorofila *a* aos 40 DAT. Aos 60 e 80 DAT as plantas cultivadas em solução 75% apresentaram os menores teores (Tabela 1). **Clorofila *b*:** aos 40 DAT as plantas não apresentaram diferença nos teores de clorofila *b*, com exceção das plantas cultivadas em solução 25%, que revelaram os menores, não diferindo das cultivadas com 100% e 75% (Tabela 1). **Antocianinas:** de maneira geral, os teores de antocianina aumentaram com o desenvolvimento. As plantas cultivadas com solução 50% apresentaram o menor teor aos 60 DAT e o maior aos 80 DAT (Tabela 1). **Carotenóides:** os maiores teores de carotenóides ocorreram aos 80 DAT, nas plantas cultivadas com 50% e 25%. Aos 60 DAT as plantas cultivadas em solução 25% e 100% revelaram os maiores teores de carotenóides (Tabela 1).

Concentração da solução nutritiva no potencial antioxidante (DPPH): aos 20 DAT as plantas cultivadas em solução nutritiva 25% apresentaram o menor potencial antioxidante (DPPH). Aos 40 DAT essas plantas e as cultivadas em solução 100% apresentaram os maiores potenciais antioxidantes (DPPH), mantido mais elevado aos 80 DAT nas plantas cultivadas em solução 100% (Tabela 2). **Fenóis totais:** aos 40 DAT, as plantas cultivadas em solução 25% apresentaram os menores teores de fenóis totais. Aos 60 DAT, os menores teores foram revelados pelas plantas cultivadas em solução 75% e aos 80 e 100 DAT as plantas

cultivadas em solução 100% apresentaram os maiores teores. **Flavonóides totais:** As plantas cultivadas em solução 25% apresentaram os menores teores de flavonóides totais em relação àquelas cultivadas com solução 75% aos 40 DAT. Aos 80 DAT, os menores teores foram revelados pelas plantas cultivadas em solução 25% e 75%. Aos 100 DAT a solução 50% apresentou o menor valor em relação àquelas cultivadas com solução 75%. **Ácido ascórbico:** aos 20 DAT as plantas cultivadas em solução 100% apresentaram o maior teor.

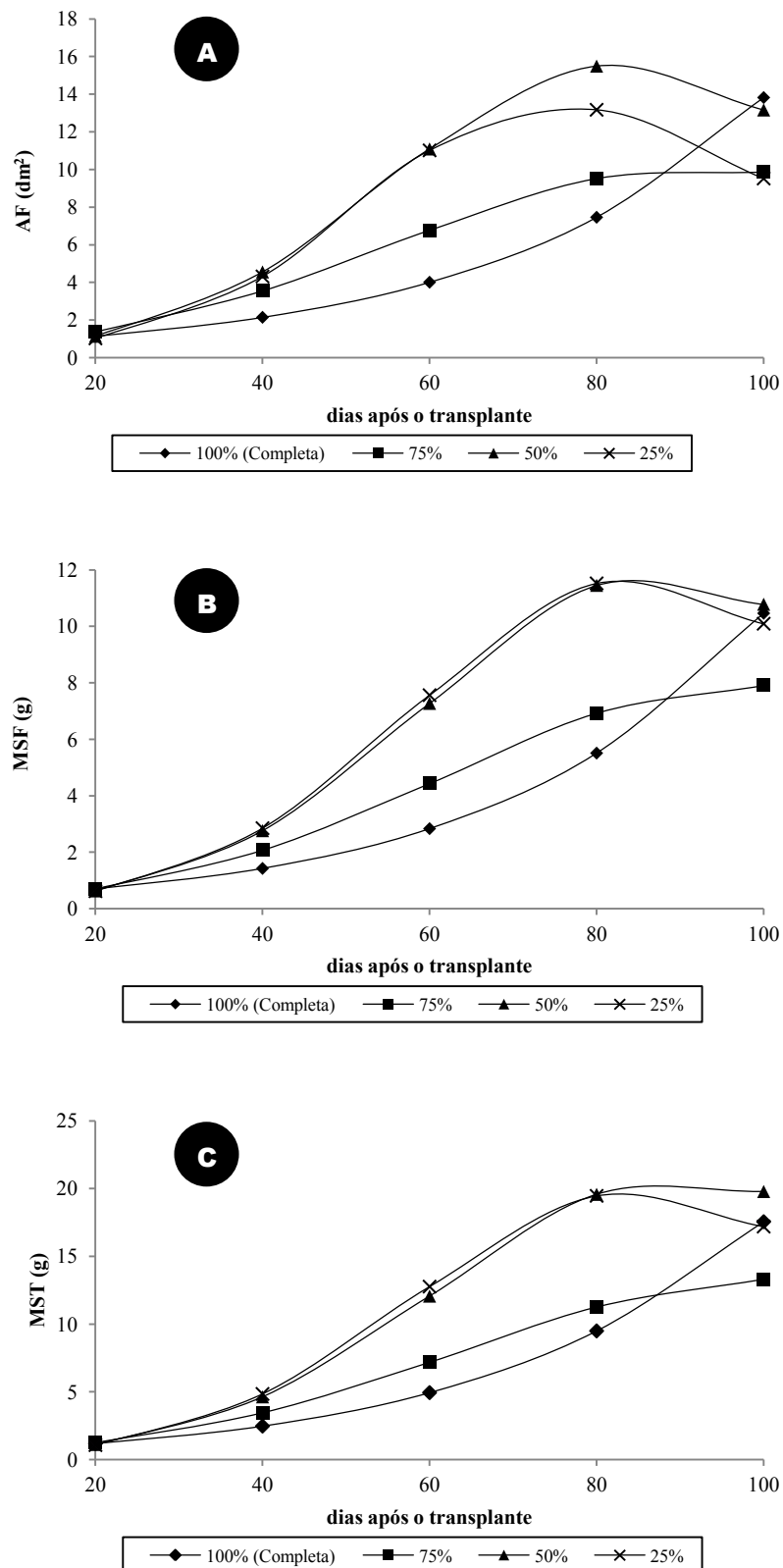


Figura 1. Área foliar (A), massa seca de folhas (B) e massa seca total (C) de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva n^o2 de Hoagland e Arnon (1950) 100% (completa), 75%, 50% e 25%, aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante. A. área foliar; B. massa seca de folhas; C. massa seca total.

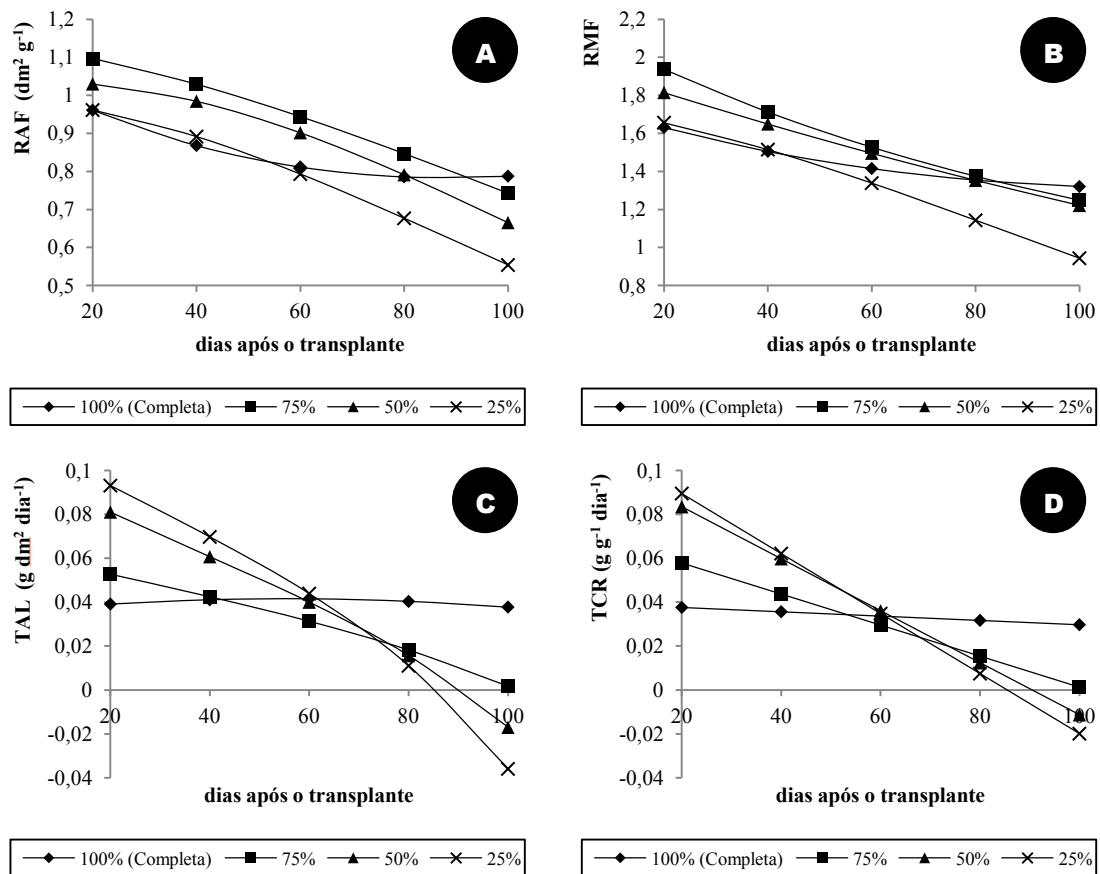


Figura 2. Razão de área foliar (A), razão de massa foliar (B), taxa assimilatória líquida (C) e taxa de crescimento relativo (D) de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva n°2 de Hoagland e Arnon (1950) 100% (completa), 75%, 50% e 25%, aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante.

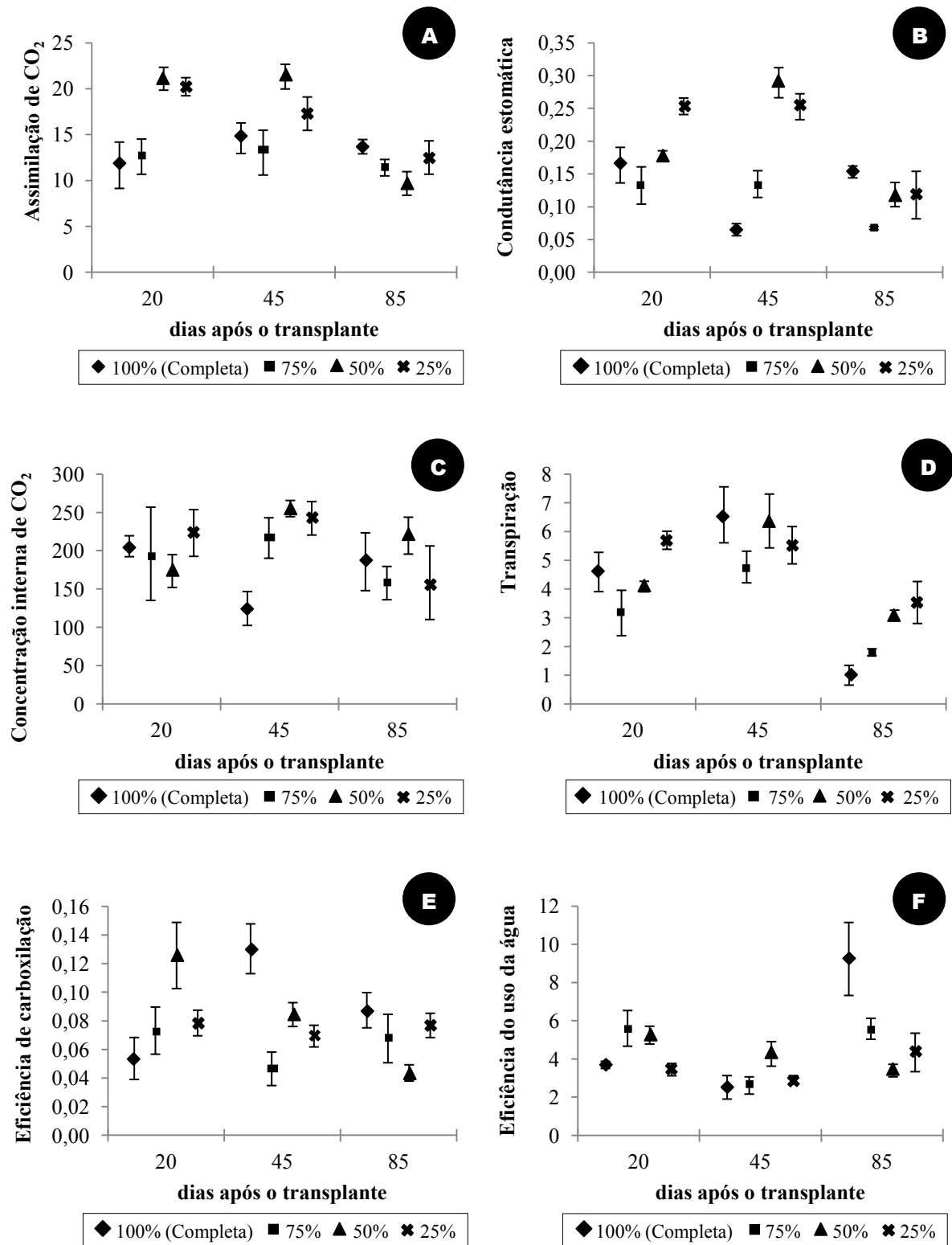


Figura 3. Assimilação de CO₂ (A, μmol m⁻² s⁻¹) (A), condutância estomática (gs, mol m⁻² s⁻¹) (B), concentração interna de CO₂ na folha (C_i, μmol mol⁻¹) (C), taxa de transpiração (E, mmol m⁻² s⁻¹) (D), eficiência de carboxilação (A/C_i) (E) e eficiência do uso da água (EUA, μmol CO₂ (mmol H₂O)⁻¹) (F) de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva n^o2 de Hoagland e Arnon (1950) 100% (completa), 75%, 50% e 25%, aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Tabela 1. Clorofilas *a* e *b*, antocianinas e carotenóides de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva nº2 de Hoagland e Arnon (1950) 100% (completa), 75%, 50% e 25%, aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Pigmentos	Tratamentos	dias após o transplante									
		20		40		60		80		100	
Clorofila <i>a</i> (mg/100g amostra)	100%	0,010 ± 0,001	Ba	0,017 ± 0,004	Ab	0,020 ± 0,003	Aa	0,020 ± 0,001	Aa	0,020 ± 0,002	Aa
	75%	0,010 ± 0,001	Ba	0,022 ± 0,004	Aab	0,010 ± 0,003	Bb	0,010 ± 0,003	Bb	0,020 ± 0,002	Aa
	50%	0,015 ± 0,003	Ba	0,027 ± 0,004	Aa	0,017 ± 0,003	Ba	0,020 ± 0,003	Ba	0,020 ± 0,002	Ba
	25%	0,012 ± 0,003	Ba	0,020 ± 0,002	Ab	0,017 ± 0,003	ABa	0,017 ± 0,004	ABa	0,017 ± 0,002	ABa
Clorofila <i>b</i> (mg/100g amostra)	100%	0,010 ± 0,001	Ca	0,027 ± 0,005	Aab	0,025 ± 0,004	ABa	0,015 ± 0,003	Ca	0,017 ± 0,003	BCa
	75%	0,017 ± 0,002	Ba	0,027 ± 0,002	Aab	0,020 ± 0,002	ABa	0,015 ± 0,006	Ba	0,020 ± 0,002	ABa
	50%	0,017 ± 0,004	Ba	0,032 ± 0,005	Aa	0,020 ± 0,002	Ba	0,015 ± 0,004	Ba	0,022 ± 0,004	Ba
	25%	0,020 ± 0,003	Aa	0,022 ± 0,003	Ab	0,020 ± 0,004	Aa	0,015 ± 0,002	Aa	0,020 ± 0,003	Aa
Antocianinas (mg/100g amostra)	100%	0,25 ± 0,014	Ca	0,47 ± 0,062	Ba	0,74 ± 0,144	Aa	0,59 ± 0,083	ABb	0,67 ± 0,090	Aa
	75%	0,32 ± 0,020	Ba	0,57 ± 0,067	Aa	0,57 ± 0,086	Aab	0,38 ± 0,086	ABc	0,57 ± 0,013	Aa
	50%	0,31 ± 0,064	Da	0,59 ± 0,016	BCa	0,44 ± 0,062	DCb	1,03 ± 0,062	Aa	0,67 ± 0,067	Ba
	25%	0,27 ± 0,044	Ca	0,46 ± 0,075	BCa	0,63 ± 0,068	ABa	0,75 ± 0,068	Ab	0,72 ± 0,111	Aa
Carotenóides (mg/100g amostra)	100%	0,06 ± 0,004	Ca	0,11 ± 0,012	BCa	0,19 ± 0,046	Aa	0,16 ± 0,026	ABb	0,18 ± 0,018	Aa
	75%	0,08 ± 0,004	Ba	0,12 ± 0,013	ABa	0,14 ± 0,018	ABbc	0,09 ± 0,009	Bc	0,16 ± 0,010	Aa
	50%	0,08 ± 0,016	Da	0,16 ± 0,021	BCa	0,12 ± 0,014	CDc	0,23 ± 0,005	Aa	0,18 ± 0,016	ABa
	25%	0,07 ± 0,010	Ba	0,11 ± 0,020	Ba	0,18 ± 0,007	Aab	0,19 ± 0,008	Aab	0,19 ± 0,026	Aa

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. As letras minúsculas nas colunas comparam médias dos tratamentos dentro das épocas e as maiúsculas nas linhas comparam médias das épocas dentro dos tratamentos.

Tabela 2. Potencial antioxidante (DPPH), fenóis totais, flavonóides totais e ácido ascórbico de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva nº2 de Hoagland e Arnon (1950) 100% (completa), 75%, 50% e 25%, aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Determinações	Tratamentos	dias após o transplante									
		20		40		60		80		100	
Potencial antioxidante (DPPH) (µm/g amostra)	100%	6,65 ± 1,49	Ba	8,92 ± 2,12	Bb	14,01 ± 1,61	Aa	15,58 ± 1,26	Aa	14,78 ± 1,50	Aa
	75%	6,77 ± 1,63	Ca	14,82 ± 1,65	Aa	11,55 ± 1,31	Ba	5,73 ± 1,19	Cb	14,34 ± 1,32	Aa
	50%	6,53 ± 0,71	Ba	16,32 ± 0,91	Aa	13,85 ± 1,94	Aa	5,91 ± 0,19	Bb	15,38 ± 1,39	Aa
	25%	2,73 ± 0,83	Cb	3,42 ± 0,59	Cc	11,52 ± 1,27	Aa	6,69 ± 1,04	Bb	13,49 ± 0,94	Aa
Fenóis totais (g/100g amostra)	100%	0,85 ± 0,10	Da	1,28 ± 0,05	Ca	2,09 ± 0,31	Ba	2,31 ± 0,06	ABa	2,55 ± 0,56	Aa
	75%	1,22 ± 0,16	Ba	1,23 ± 0,12	Ba	1,46 ± 0,27	ABb	1,17 ± 0,20	Bc	1,80 ± 0,12	Ab
	50%	1,10 ± 0,03	Ca	1,51 ± 0,29	ABCa	1,91 ± 0,17	Aa	1,44 ± 0,18	BCbc	1,73 ± 0,11	ABb
	25%	0,92 ± 0,06	Ba	0,70 ± 0,11	Bb	2,04 ± 0,10	Aa	1,83 ± 0,15	Ab	1,72 ± 0,22	Ab
Flavonóides totais (g/100g amostra)	100%	2,95 ± 0,06	Ca	3,10 ± 0,17	BCab	3,37 ± 0,16	Aa	3,33 ± 0,14	ABa	3,35 ± 0,06	Aab
	75%	3,05 ± 0,00	BCa	3,30 ± 0,16	ABa	3,35 ± 0,08	Aa	2,98 ± 0,10	Cb	3,46 ± 0,09	Aa
	50%	2,89 ± 0,03	Ca	3,09 ± 0,06	BCab	3,29 ± 0,05	ABa	3,35 ± 0,03	Aa	3,20 ± 0,08	ABb
	25%	2,88 ± 0,01	Ba	3,01 ± 0,04	Bb	3,33 ± 0,06	Aa	3,05 ± 0,17	Bb	3,37 ± 0,09	Aab
Ácido Ascórbico (g/100g amostra)	100%	0,022 ± 0,002	Aa	0,023 ± 0,003	Aa	0,016 ± 0,002	Ba	0,014 ± 0,001	Ba	0,012 ± 0,002	Ba
	75%	0,017 ± 0,001	Ab	0,016 ± 0,002	ABa	0,014 ± 0,001	ABa	0,014 ± 0,002	ABa	0,012 ± 0,002	Ba
	50%	0,016 ± 0,001	ABCb	0,020 ± 0,000	Aa	0,017 ± 0,001	ABa	0,013 ± 0,001	BCa	0,012 ± 0,000	Ca
	25%	0,014 ± 0,002	Bb	0,022 ± 0,003	Aa	0,014 ± 0,001	BCa	0,016 ± 0,001	Ba	0,010 ± 0,001	Ca

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. As letras minúsculas nas colunas comparam médias dos tratamentos dentro das épocas e as maiúsculas nas linhas comparam médias das épocas dentro dos tratamentos.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento das plantas cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações revelou alterações ao longo das épocas de colheita. De forma geral, os maiores valores de MST, MSF e AF foram observados nas plantas cultivadas em solução 25% e 50%, indicando maior crescimento da espécie nessas condições. Plantas cultivadas em solução 75% apresentaram crescimento intermediário, sendo o mais baixo verificado em plantas cultivadas com solução 100%, o que permite concluir que o aumento da concentração da solução nutritiva inibiu durante algum tempo ou atrasou o desenvolvimento da espécie. Embora cada espécie apresente exigência nutricional diferente (Malavolta, 2006), o aumento em 25% na concentração da solução nutritiva completa (100%) proposta por Furlani et al. (1999) foi prejudicial ao desenvolvimento de plantas de coentro e salsa (Luz et al. 2012).

Esses resultados foram confirmados com os índices fisiológicos. A RAF, que representa a área foliar da planta utilizada para a fotossíntese, tende ao decréscimo à medida que as plantas crescem, pois com o aumento do número de folhas ocorre a interferência das folhas novas sobre as antigas, diminuindo a área foliar útil em função do autossombreamento (Benincasa, 2003).

As plantas cultivadas em soluções diluídas apresentaram RAF decrescente. O maior decréscimo denota crescimento mais rápido, o que pode ser observado para as plantas cultivadas com solução 25% e 50%. Já as plantas cultivadas em solução 100% mantiveram RAF estável durante todo o desenvolvimento, comprovando crescimento mais lento. O aumento da concentração de fósforo em 50% também diminuiu a RAF em plantas de *Mentha x piperita* L. cultivadas em solução completa nº2 de Hoagland e Arnon (1950) (David et al., 2007).

O decréscimo da razão da massa foliar revelado em todos os tratamentos (Figura 2-B) está de acordo com estudos identificados na literatura sobre esse índice fisiológico. Para garantir o crescimento, os fotoassimilados produzidos nas folhas são translocados para os demais órgãos (Benincasa, 2003), logo, a diminuição dessa variável infere maior crescimento vegetal. As plantas cultivadas em solução 25% apresentaram o mais rápido decréscimo da curva, seguidas daquelas cultivadas com 50% e 75%. Embora tendo avaliado alumínio, que pode para algumas espécies, na dependência da concentração, ser elemento benéfico, Tecchio

(2005) cultivou porta enxertos de videiras e verificou que as plantas submetidas a baixas adições de alumínio em solução nutritiva apresentaram maior redistribuição de massa seca das folhas para o restante da planta.

A TAL expressa fotossíntese líquida, ou seja, o balanço entre o que é produzido no interior dos cloroplastos e o consumido pelo processo respiratório. O crescimento está diretamente relacionado ao aumento da respiração e conseqüentemente a redução desse índice, o que indica maior eficiência fotossintética da planta (Benincasa, 2003). As plantas cultivadas em solução 25% e 50% apresentaram maior eficiência fotossintética no período, revelado pelo decréscimo mais rápido da curva.

A TCR reflete o aumento de massa seca ou área foliar que está diretamente relacionado ao material vegetal pré-existente na planta (Radford, 1967). As elevadas taxas nas primeiras avaliações, com posteriores decréscimos, indicam maior acúmulo de matéria seca em relação ao material pré-existente no início do desenvolvimento (Boaro et al., 1996; David et al., 2007), nas plantas cultivadas em solução nutritiva 25% e 50%, acúmulo intermediário nas cultivadas em solução 75% e menor nas plantas submetidas a solução 100%. A queda mais acentuada da curva também indica crescimento mais rápido do vegetal.

Esses resultados concordam com David e Boaro (2009) que cultivaram *Mentha piperita* L. e observaram que TAL e TCR apresentaram quedas mais lentas, quando as plantas foram submetidas ao tratamento com nível completo de nutrientes. As curvas decrescentes, com quedas acentuadas foram verificadas para as plantas cultivadas em solução menos concentrada.

Esses resultados observados no crescimento do vegetal sugerem que a concentração de sais da solução nutritiva pode ter sido um fator de estresse para as plantas, gerando distúrbios funcionais no crescimento, comprometendo a produção da biomassa e limitando a fotossíntese (Larcher, 2006).

A variação na disponibilidade de nutrientes minerais também pode interferir com as taxas de assimilação (von Caemmerer e Farquhar, 1981), que assim como a taxa de transpiração, é influenciada diretamente pela condutância estomática, devido ao processo de abertura e fechamento estomático (Farquhar e Sharkey, 1982).

Aos 20 e 45 DAT houve aumento da taxa de assimilação de CO₂ nas plantas cultivadas em solução 25% e 50%. A condutância estomática e a concentração interna de CO₂ também foram maiores, o que pode explicar a maior assimilação. Já as plantas cultivadas em

solução 100% e 75% revelaram, de maneira geral, assimilação de CO₂, condutância estomática e concentração interna de CO₂ mais baixos.

No entanto, aos 85 DAT as plantas cultivadas em solução 100% apresentaram taxas de assimilação, condutância estomática e concentração interna de CO₂ semelhantes às daquelas das plantas cultivadas com solução 25% e 50%. Como essas plantas transpiram menos a sua eficiência para o uso da água foi maior, nessa época. Isso pode explicar os resultados de TAL (Figura 2) e da AF, MSF e MST mais elevados a partir dos 80 DAT (Figura 1). O aumento na concentração de sais na solução nutritiva também ocasionou redução na condutância estomática, taxas de transpiração e concentração interna de CO₂ nas folhas de plantas de berinjela cultivadas por Bosco et al. (2009).

As plantas cultivadas com solução 25% apresentaram os menores índices do potencial antioxidante durante todo o desenvolvimento. Os baixos teores de ácido ascórbico, aos 20 DAT, de flavonóides totais aos 40 e 80 DAT, de antocianinas aos 80 DAT e de fenóis totais a partir dos 60 DAT denotam a menor capacidade antioxidante dessas plantas em relação às demais, o que sugere que nessas condições de cultivo, as plantas não estavam submetidas a estresse nutricional, por excesso de nutrientes.

As plantas submetidas aos demais tratamentos apresentaram elevado potencial antioxidante aos 20 DAT, com maior índice de ácido ascórbico nas plantas cultivadas em solução 100%. Aos 40 DAT, as plantas cultivadas em solução 50% e 75% apresentaram o maior potencial antioxidante, que pode ser explicado pelos maiores teores de fenóis totais e flavonóides totais. As plantas cultivadas em solução 100%, aos 80 DAT apresentaram os maiores teores de flavonóides e fenóis totais, e consequentemente, maior potencial antioxidante, nessa avaliação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa de mestrado concedida à primeira autora.

REFERÊNCIAS

Antunes MDC, Cavaco AM (2010) The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour Fragr. J.* 25:351-356.

- Awad AM, Jager A, van Westing LM (2000) Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. *Scientia Horticulturae* 83:249-263.
- Benincasa MMP (2003) Análise de crescimento de plantas (noções básicas). FUNEP, Jaboticabal.
- Boaro CSF, Rodrigues JD, Pedras JF, Rodrigues SD, Delachiave MEA, Ono EO (1996) Avaliação do crescimento do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca) sob diferentes níveis de magnésio. *Biotemas* 9:15-28.
- Bosco MRO, Oliveira AB, Hernandez FFF, Lacerda CF (2009) Efeito do NaCl sobre o crescimento, fotossíntese e relações hídricas de plantas de berinjela. *Revista Ceres* 56:296-302.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 54:1822-1828.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *J Food Sci. Technol.* 28:25-30.
- David EFS, Mischán MM, Boaro CSF (2007) Desenvolvimento e rendimento de óleo essencial de menta (*Mentha x piperita* L.) cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. *Biotemas* 20:15-26.
- David EFS, Boaro CSF (2009) Translocação orgânica, produtividade e rendimento de óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com variação dos níveis de N, P, K e Mg. *Rev. Bras. Pl. Med.* 11:236-246.
- Dorman HJD, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316.
- Farquhar GD, Sharkey TD (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 33:317-345.
- Figueiredo AC, Miguel MG (2010) Aromatic plants, spices and volatiles in food and beverages. *Flavour Fragr. J.* 25:251-252.
- Furlani PR, Silveira LCP, Bolonhesi D, Faquin V (1999). Cultivo hidropônico de plantas. IAC, Campinas. (Boletim Técnico 180).
- Grattan SR, Grieve CM (1999) Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* 78:127-157.

- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circ./Calif. Agric. Exp. Stn.* 347:1-32.
- Hunt, S (2003) Measurements of photosynthesis and respiration in plants. *Physiologia Plantarum* 117:314-325.
- IAL (2005) Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4th ed. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.
- Ietswaart JH A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). The Hague/Boston/London, Leiden Univ. Press (1980).
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agricul. Food Chem.* 47:3954-3962.
- Larcher W (2006) *Ecofisiologia vegetal*. RiMa, São Carlos.
- Le Bot J, Adamowicz S, Robin P (1998) Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. *Scientia Horticulturae* 74:47-82.
- Luz JMQ, Andrade LV, Dias FF, Silva MAD, Haber LL, Oliveira RC (2012) Produção hidropônica de coentro e salsa crespa sob concentrações de solução nutritiva e posições das plantas nos perfis hidropônicos. *Biosci. J.* 28:589-597.
- Malavolta E (2006) *Manual de nutrição mineral de plantas*. Ceres, São Paulo.
- Melo EA, Maciel MIS, Lima VLAG, Leal FLL, Caetano ACS, Nascimento RJ (2006) Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26:639-644.
- Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A (2001) The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry* 57:65-69.
- Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A (2003) The β -ocimene chemotype of essential oils of the inflorescences and the leaves with stems from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* growing wild in Lithuania. *Biochem. Syst. Ecol.* 31:269-278.
- Pouvova D, Kokoskova B, Pavela R, Rysanek P (2004) Effectivity of plant essential oils against *Clavibacter michiganensis*, *in vitro*. *Zemdirbyste-Agriculture* 95:440-446.
- Portes TA, Castro Junior LG (1991) Análise de crescimento de plantas: Um programa computacional auxiliar. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 3:53-60.

Radford PS (1967) Growth analysis formula; their use and abuse. *Crop Sci.* 7:171-175.

Rossetto CJ, Bortoletto N, Carvalho CRL, Castro JV, Walder JMM, Nogueira NL, Arthur V, Lopes LA (2009) Mango resistance to fruit flies. I Varietal selection and mechanisms of resistance. *Acta Horticulturae* 820:575-580.

Sims DA, Gamon JA (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81:337-354.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299:152-178.

Souza VC, Lorenzi, H (2012) Lamiaceae. In: Souza VC, Lorenzi H (eds.), *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III*, pp.644-649. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo.

Tecchio MA (2005) Levantamento nutricional e diagnóstico agrônômico da videria 'Niagara Rosada' em Jundiá e Louveira-SP. Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Tese de Doutorado.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:44-84.

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JÁ (2008) Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43:526-531.

von Caemmerer S, Farquhar GD (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376-87.

CAPÍTULO II

**Composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*
cultivado em solução nutritiva**

Artigo elaborado nas normas da revista The Journal of Essential Oil Research

Composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva

Thaís Ribeiro Carboni^{a*}, Roselaine Facanali^b, Daniela Matsumoto^b, Luiz Fernando Rolim de Almeida^a, Márcia Ortiz Mayo Marquez^b e Carmen Sílvia Fernandes Boaro^a

^a Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, Brasil; ^b Laboratório de Produtos Naturais, Instituto Agronômico, Campinas, Brasil.

Resumo

Plantas de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* foram cultivadas em solução nutritiva nº2 de Hoagland e Arnon ⁽¹⁾ 100% (completa) e 75%, 50% e 25%. O objetivo do estudo foi avaliar a influência da solução nutritiva completa e diluída na composição química do óleo essencial da espécie durante o seu desenvolvimento. Aos 60, 80 e 100 dias após o transplante para a solução nutritiva, as plantas foram colhidas e secas em estufa de circulação forçada de ar a 40°C. O óleo essencial (OE) foi extraído de folhas e caules secos por hidrodestilação em aparato Clevenger e a identificação dos compostos químicos, avaliada por GC/MS. A análise revelou a presença de 25 substâncias com predominância da classe química dos sesquiterpenos, sendo o germacreno D um dos compostos majoritários. Os resultados obtidos revelam que os compostos majoritários dos OEs de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, com exceção do germacreno D, apresentaram influência da concentração da solução nutritiva e da época de colheita ao longo do desenvolvimento da espécie. Os teores de sesquiterpenos tenderam a aumentar nas plantas cultivadas em soluções mais concentradas (100% e 75%), o que pode sugerir possível estresse causado pelo aumento dos nutrientes.

Palavras chave

Orégano, Lamiaceae, germacreno D, monoterpenos, sesquiterpenos, hidroponia

Abstract

Origanum vulgare L. ssp. *vulgare* plants were grown with 100% (complete), 75%, 50%, and 25% Hoagland and Arnon (1950) #2 nutrient solution ⁽¹⁾. The objective of the study was to evaluate the influence of the complete nutrient solution with the various diluted solutions, with regards to the chemical composition of the essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp.

vulgare, during its growth. At 60, 80 and 100 days after transplantation to the nutrient solution, the plants were harvested and oven dried forced circulation of air at 40 ° C. The essential oil (EO) was extracted from leaves and stalks by hydrodistillation in Clevenger apparatus and identification of chemical compounds was assessed by GC / MS. The analysis revealed the presence of 25 substances with predominantly chemical class of sesquiterpenes, that germacrene D is one of the major compounds. The results of this experiment indicates that the major compounds of essential oil, with the exception of germacrene D, were shown to be influenced by the nutrient solution concentration, as well as the and harvest timeframe, throughout the development of the species. The percentage of sesquiterpenes tended to increase in plants cultivated in more concentrated solutions (100% and 75%). These results suggest a possible stress caused by the increase of nutrients.

Key Word Index

Oregano, Lamiaceae, germacrene D, monoterpenes, sesquiterpenes, hydroponics

Introdução

A atual classificação de ordens e famílias de plantas com flores, o APG III ⁽²⁾, refere a família Lamiaceae como pertencente a ordem Lamiales. Com cerca de 300 gêneros e 7.500 espécies, a família se destaca pela riqueza em plantas aromáticas como a lavanda (*Lavandula angustifolia*), a erva-cidreira (*Melissa officinalis*), o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e o orégano (*Origanum vulgare*) ⁽³⁾.

Com base em características morfológicas, a espécie *Origanum vulgare* L., apresenta seis subespécies, sendo elas, *gracile* (Kock) Ietswaart, *glandulosum* (Desfontaines) Ietswaart, *hirtum* (Link) Ietswaart, *vulgare* L., *virens* (Hoffmannsegg et Link) Ietswaart and *viride* (Boissier) Hayek ⁽⁴⁾.

Mesmo depois da revisão do gênero *Origanum* por Ietswaart, algumas dúvidas ainda persistem na diferenciação das subespécies de *O. vulgare* L. ⁽⁵⁾. A tradicional análise taxonômica das plantas aromáticas se baseou em características morfológicas, mas com base na importância da composição dos metabólitos secundários sintetizados pela planta, a quimiotaxonomia também deve ser considerada, complementando os dados já existentes sobre a sistemática e filogenia da espécie ⁽⁶⁾.

Populações nativas de *Origanum vulgare* L. na Itália, apresentaram características morfológicas pertencentes a subespécie *viride*. Entretanto, o teor e a composição do óleo essencial (OE) apresentaram resultados diferentes dos esperados e mais próximos aos de outras subespécies relatadas anteriormente nessas mesmas populações. Esses resultados denotam a necessidade de estudos adicionais na classificação da espécie em suas várias subespécies, com base, por exemplo, na composição química do OE ⁽⁷⁾.

A importância econômica das plantas aromáticas e medicinais está relacionada diretamente com a composição química do OE produzido por elas. A dificuldade de se trabalhar com esses OEs é a falta de estabilidade que apresentam, uma vez que, sua síntese está intimamente ligada à exposição da planta a fatores ambientais ⁽⁸⁾, entre os quais, variações de temperatura, disponibilidade de luz, recursos hídricos e nutrientes minerais do solo ⁽⁹⁾.

Em ambiente natural, a variação de nutrientes minerais no solo alterou o padrão de emissão de monoterpenos em espécies na região do Mediterrâneo, incluindo uma espécie da família Lamiaceae. As emissões de monoterpenos foram relacionadas a disponibilidade de nitrogênio e fósforo, enquanto sua dependência em cálcio e potássio foi variável dentro das espécies ⁽¹⁰⁾.

Com base no exposto e considerando que as características químicas dos OEs podem variar com as coordenadas geográficas que atuam sobre a produção dos tricomas glandulares ⁽¹¹⁾, com a escolha das folhas ou inflorescências que serão utilizadas para a extração do OE ⁽¹²⁾, com a quantidade de nutrientes disponíveis no solo e épocas de colheita da espécie ⁽¹³⁾, o presente estudo se justifica, uma vez que seu objetivo foi avaliar a influência da solução nutritiva completa e diluída, e portanto, com variação da concentração dos nutrientes, na composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* durante o seu desenvolvimento.

Experimento

Material vegetal: estacas de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* foram obtidas de ramos aéreos de plantas matrizes cultivadas a partir de sementes comerciais (Topseed Garden®, da linha Blue Line), em canteiros. A seguir, as estacas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno expandido, utilizando-se o substrato comercial Rendmax® e mantidas em câmara

de nebulização intermitente, até o enraizamento. Após 40 dias, as plantas enraizadas foram colocadas em casa de vegetação tipo Paddy-Fan e transferidas das bandejas de substrato para vasos de polietileno com capacidade de seis litros, contendo solução nutritiva nº2 de Hoagland e Arnon ⁽¹⁾ 100% (completa) e solução 75%, 50% e 25%. O pH e a condutividade elétrica da solução nutritiva foram avaliados durante todo o experimento e mantidos entre 6,0 e 6,5 e entre 1,5 e 2,5 mS cm⁻¹, respectivamente. A solução nutritiva foi continuamente arejada por meio de soprador rotativo, renovada sempre que as especificações acima se alteraram e seu volume nos vasos foi completado com água deionizada. Em delineamento inteiramente casualizado, as três plantas dos diferentes tratamentos, em três repetições, foram colhidas aos 60, 80 e 100 dias após o transplante (DAT), quando as folhas e os caules foram submetidos à secagem em estufa de circulação forçada de ar, na temperatura de 40°C por 72 horas.

Extração do óleo essencial: o OE foi extraído das folhas e caules secos, por hidrodestilação em aparato Clevenger durante 2 horas, e posteriormente, armazenado em frascos de vidro, devidamente identificados e mantidos em *freezer* em temperatura abaixo de 4°C.

Análise da composição química: a análise quantitativa da composição química foi realizada por meio de cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010/AOC-20i), dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25mm x 0,25 µm), hélio como gás de arraste, vazão de 1,0 mL min⁻¹, injetor a 240°C, detector a 230°C, split 1/20 e o seguinte programa de temperatura: 60°C-180°C, 3°C min⁻¹; 180°C-280°C; 10°C min⁻¹; 280°C (5min). A análise qualitativa da composição química dos óleos essenciais foi conduzida em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV, dotado de coluna capilar de sílica fundida OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25µm), hélio como gás de arraste (1,0 mL min⁻¹), split: 1/20, injetor a 240°C, detector a 230°C e o seguinte programa de temperatura: 60°C-240°C, 3°C min⁻¹.

Identificação dos constituintes químicos: foi efetuada por análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema GC-MS (Nist 62.lib), literatura e índice de retenção das substâncias com os obtidos pela injeção de uma serie homóloga de *n*-alcanos no programa de temperatura anteriormente descrito , aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz ⁽¹⁴⁾.

Análise estatística: Os compostos majoritários foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância, com auxílio do programa computacional SISVAR ⁽¹⁵⁾.

Resultados e Discussão

A análise cromatográfica das amostras do OE de *O. vulgare* ssp. *vulgare* revelou a presença de 25 compostos e a predominância de sesquiterpenos (Tabela 1). O composto majoritário presente nas amostras foi o germacreno D, com porcentagem entre 20,64 e 30,79%, seguido do somatório de (*Z*) e (*E*)- β -ocimeno, β -cariofileno, sabineno, biciclogermacreno, espatulenol e óxido de cariofileno na dependência da concentração da solução nutritiva utilizada e da época de colheita das plantas (Tabela 2).

Os compostos majoritários identificados nesse estudo coincidem com os apresentados na literatura. A composição dos OEs da subespécie *vulgare* foi avaliada em plantas selvagens coletadas em 10 localidades do distrito de Vilnius, na Lituânia. Os quatro principais compostos, germacreno D (10-16,9%), β -ocimeno (14,9-21,6), β -cariofileno (10,8-15,4%) e sabineno (6,4-14,2%), foram verificados em 8 localidades ⁽¹⁶⁾. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados nos OEs de grupos de espécimes cultivados na França ⁽¹⁷⁾ e na Itália ⁽¹⁸⁾. Esses resultados concordantes indicam que independente das condições de cultivo ou crescimento da espécie, o óleo da subespécie *vulgare* apresenta o perfil químico revelado no presente estudo, no tocante aos seus componentes majoritários.

Neste trabalho, o germacreno D apresentou-se como um dos compostos majoritários principais, não sendo observada diferença nos seus teores entre as plantas cultivadas com as várias soluções ao longo de seu desenvolvimento. Óleos ricos em germacreno D, reconhecido precursor de muitas estruturas de sesquiterpenos ⁽¹⁹⁾, apresentaram atividade antimicrobiana em espécies da família Annonaceae ⁽²⁰⁾, evidenciando seu potencial farmacológico.

Em solução completa, as plantas apresentaram OE com os teores mais baixos de sabineno, aos 60 DAT, quando comparados aos OE dos demais tratamentos. Aos 100 DAT houve diminuição nos teores de (*Z*) e (*E*) β -ocimeno e sabineno, e aumento nos teores de óxido de cariofileno (Tabela 2).

Aos 80 DAT, as plantas cultivadas em solução 75% apresentaram óleo com os menores teores de β -cariofileno e os maiores de biciclogermacreno, espatulenol e óxido de cariofileno, quando comparado ao dos demais tratamentos (Tabela 2).

Plantas cultivadas em solução 50% apresentaram OE com diminuição dos teores de (*Z*) e (*E*) β -ocimeno aos 100 DAT. Aos 100 DAT as plantas cultivadas em solução 25% apresentaram diminuição nos teores de β -cariofileno e aumento de sabineno quando comparados aos demais tratamentos (Tabela 2).

Germacreno D, somatório de (*Z*) e (*E*) β -ocimeno e β -cariofileno foram compostos majoritários observados em todos os tratamentos e épocas de colheita. Ao longo do desenvolvimento, as plantas cultivadas em solução completa não apresentaram o sabineno como composto majoritário, revelando nessa condição óxido de cariofileno aos 100 DAT. Em solução 75%, aos 80 DAT, o teor de sabineno não foi expressivo, diferentemente dos teores de biciclogermacreno, espatulenol e o óxido de cariofileno que aumentaram e passaram a ser considerados majoritários.

Aumentos dos teores de sesquiterpenos foram identificados nas plantas cultivadas em solução 100% (completa) e 75% (Figura 1). O OE extraído das plantas cultivadas em solução completa apresentou aos 100 DAT aumento de aproximadamente 20% nos teores de sesquiterpenos em relação à média dos teores observados nas plantas colhidas aos 60 e 80 DAT. As plantas cultivadas em solução 75% apresentaram aos 80 DAT, OE com aumento de aproximadamente 30% nos teores de sesquiterpenos em relação à média dos teores observados nas plantas colhidas aos 60 e 100 DAT. Dessa forma, quando soluções nutritivas mais concentradas foram utilizadas (100% e 75%) a partir dos 80 DAT as plantas apresentaram maiores teores de sesquiterpenos.

Esses resultados concordam com os observados por Duhl et al. ⁽¹⁹⁾, que ressaltaram que vários fatores ambientais influenciam a produção e a emissão dos sesquiterpenos pelas plantas. Embora a influência da luminosidade, temperatura e sazonalidade sejam as variáveis mais estudadas, a disponibilidade hídrica e de minerais no solo, além dos níveis de estresse a que a planta está submetida, contribuem para a alteração das quantidades desses terpenos sintetizados. Além disso, plantas submetidas a elevadas concentrações de sais podem apresentar distúrbios funcionais no crescimento, limitando a fotossíntese, alterando os demais processos, sendo fator de estresse ⁽²¹⁾.

Por outro lado, as plantas cultivadas com as soluções nutritivas menos concentradas (50% e 25%) revelaram maior equilíbrio entre os teores de sesqui e monoterpenos (Figura 1).

Os resultados obtidos revelam que os compostos majoritários dos OEs de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, com exceção do germacreno D, apresentaram influência da concentração da solução nutritiva e da época de colheita ao longo do desenvolvimento da espécie. Os teores de sesquiterpenos tenderam a aumentar nas plantas cultivadas em soluções mais concentradas (100% e 75%), o que pode sugerir um possível estresse causado pelo aumento dos nutrientes.

Tabela 1. Composição do óleo essencial (%) de *Origanum vulgare* L. spp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva 100% (completa), 75%, 50% e 25%. Médias das colheitas realizadas aos 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Classe Química/ Substância	100%			75%			50%			25%			IR Cal*	IR Lit**
	dias após o transplante			dias após o transplante			dias após o transplante			dias após o transplante				
	60	80	100	60	80	100	60	80	100	60	80	100		
Monoterpenos														
α-pineno	Tr	0,11	0,53	0,33	tr	0,20	0,26	0,23	0,26	0,18	0,20	0,21	935	939
Sabineno	2,74	2,36	1,63	11,68	1,90	10,55	10,72	5,83	5,70	7,58	5,27	14,95	974	975
1-octen-3-ol	2,55	0,78	0,49	0,87	0,54	1,46	0,94	2,97	2,22	2,29	1,47	2,01	978	979
Mirceno	0,84	1,50	0,74	4,37	0,52	4,83	3,71	1,97	3,55	2,47	3,32	4,30	992	990
p-cimeno	0,42	0,52	0,36	1,43	0,30	0,72	0,25	0,41	0,33	0,40	0,42	0,76	1024	1024
limoneno	0,44	0,48	0,39	0,82	0,40	1,01	0,93	1,03	1,00	0,83	1,04	1,31	1029	1029
1,8-cineol	0,14	0,18	tr	0,30	Tr	0,30	0,20	0,35	0,58	0,27	0,15	0,49	1031	1031
(Z)-β-ocimeno	16,45	19,16	6,01	18,07	7,56	11,69	21,72	26,07	13,34	23,11	18,31	13,43	1037	1037
(E)-β-ocimeno	6,33	4,72	2,18	3,59	3,08	3,78	5,25	5,76	3,48	6,28	4,88	2,98	1047	1050
γ-terpineno	0,64	1,25	1,27	0,67	0,48	1,73	1,15	1,23	0,69	1,64	0,87	1,62	1058	1059
Linalol	1,50	1,11	0,39	0,40	0,67	0,29	0,38	4,75	0,99	0,47	0,91	0,50	1100	1095
Monoterpenos (%)	32,04	32,15	13,98	42,53	15,44	36,53	45,50	50,60	32,12	45,52	36,85	42,54		
Sesquiterpenos														
β-bourboneno	0,32	0,33	0,86	0,23	0,46	0,32	0,23	0,32	0,58	0,21	0,46	0,67	1385	1388
β-elemeno	0,91	0,71	0,66	0,56	0,64	0,69	0,54	0,72	0,84	0,58	0,69	0,66	1392	1390
β-cariofileno	12,66	12,62	14,06	12,48	11,75	16,46	10,64	7,26	11,13	10,80	17,27	8,06	1420	1419
α-humuleno	1,83	1,72	2,53	2,07	2,08	3,03	1,73	0,73	1,61	1,53	2,08	1,32	1453	1454
allo-aromadendreno	0,32	0,49	0,36	0,21	0,54	0,16	0,16	0,29	0,28	0,18	0,39	0,30	1461	1460
germacreno D	30,29	30,79	27,56	20,64	28,23	29,62	22,76	24,60	26,72	23,41	25,35	28,97	1482	1481
biciclogermacreno	6,15	5,49	4,99	3,93	7,63	1,72	5,24	2,19	6,34	4,62	2,19	1,27	1496	1500
(E,E)-α-farneseno	1,47	2,76	1,21	1,91	2,52	5,59	2,60	1,32	2,59	2,02	2,47	4,97	1509	1505
γ-cadineno	0,21	0,23	0,49	0,25	0,30	0,20	0,17	0,27	0,23	0,20	0,33	0,30	1514	1513
δ-cadineno	1,00	1,01	1,21	1,13	1,21	0,63	0,78	1,00	0,88	1,09	1,26	0,80	1524	1523
Espatuleno	2,33	2,82	2,80	3,27	7,69	0,36	1,51	1,11	3,29	1,41	0,88	0,50	1577	1578
óxido de cariofileno	2,02	2,45	15,46	1,87	7,53	0,31	1,20	1,36	5,03	1,27	2,40	1,53	1582	1583
humuleno epoxy II	Tr	0,39	1,76	0,40	0,94	0,39	0,28	0,17	0,63	0,16	0,28	0,28	1607	1608
α-muurolo	0,35	0,55	1,13	0,83	0,88	0,41	0,46	0,68	0,58	0,65	0,75	0,69	1647	1646
Sesquiterpenos (%)	59,86	62,37	75,10	49,77	72,39	59,86	48,31	42,02	60,74	48,14	56,81	50,29		
Total identificado (%)	91,90	96,79	91,19	92,30	87,83	96,39	93,81	92,62	92,86	93,66	93,65	92,82		

*IR Cal = índice de retenção de Kovats calculado; **IR Lit = índice de retenção de Kovats da literatura consultada ⁽²²⁾; tr = (<0,08).

Tabela 2. Teor (%) dos compostos majoritários do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva 100% (completa), 75%, 50% e 25%. Médias das colheitas realizadas aos 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Compostos	Tratamentos	dias após o transplante					
		60		80		100	
Germacreno D	100%	30,28		30,78		27,56	
	75%	20,64		28,23		29,61	
	50%	22,75		24,59		26,72	
	25%	23,41		25,35		28,97	
Σ (Z)-β-ocimeno (E)-β-ocimeno	100%	22,78	Aa	23,87	Aab	8,18	Ba
	75%	21,66	Aa	10,64	Ab	15,46	Aa
	50%	26,97	ABa	31,83	Aa	16,81	Ba
	25%	29,39	Aa	23,19	ABab	16,40	Ba
β-cariofileno	100%	12,66	Aa	12,62	Aab	14,06	Aab
	75%	12,48	Aa	11,75	Aab	16,46	Aa
	50%	10,64	Aa	7,25	Ab	11,12	Aab
	25%	10,80	ABa	17,27	Aa	8,06	Bb
Biciclogermacreno	100%	6,15	Aa	5,48	Aab	4,99	Aab
	75%	3,92	ABa	7,62	Aa	1,72	Bab
	50%	5,24	Aa	2,19	Ab	6,34	Aa
	25%	4,62	Aa	2,19	Ab	1,27	Ab
Sabineno	100%	2,73	Ab	2,35	Aa	1,12	Ac
	75%	11,68	Aa	1,89	Ba	10,54	Aab
	50%	10,72	Aab	5,82	Aa	5,69	Abc
	25%	7,58	ABab	5,27	Ba	14,95	Aa
Espatuleno	100%	2,33	Aa	2,82	Ab	2,80	Aa
	75%	3,26	Ba	7,69	Aa	0,35	Ba
	50%	1,50	Aa	1,11	Ab	3,29	Aa
	25%	1,40	Aa	0,88	Ab	0,49	Aa
Óxido de cariofileno	100%	2,02	Ba	2,44	Bab	15,46	Aa
	75%	1,87	Ba	7,53	Aa	0,31	Bb
	50%	1,19	Aa	1,36	Ab	5,03	Ab
	25%	1,27	Aa	2,39	Aab	1,53	Ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. As letras minúsculas nas colunas comparam médias dos tratamentos dentro das épocas de coleta e as maiúsculas nas linhas comparam médias das épocas de coleta em cada tratamento. Quando as comparações não apresentaram diferenças significativas as letras não foram utilizadas na tabela.

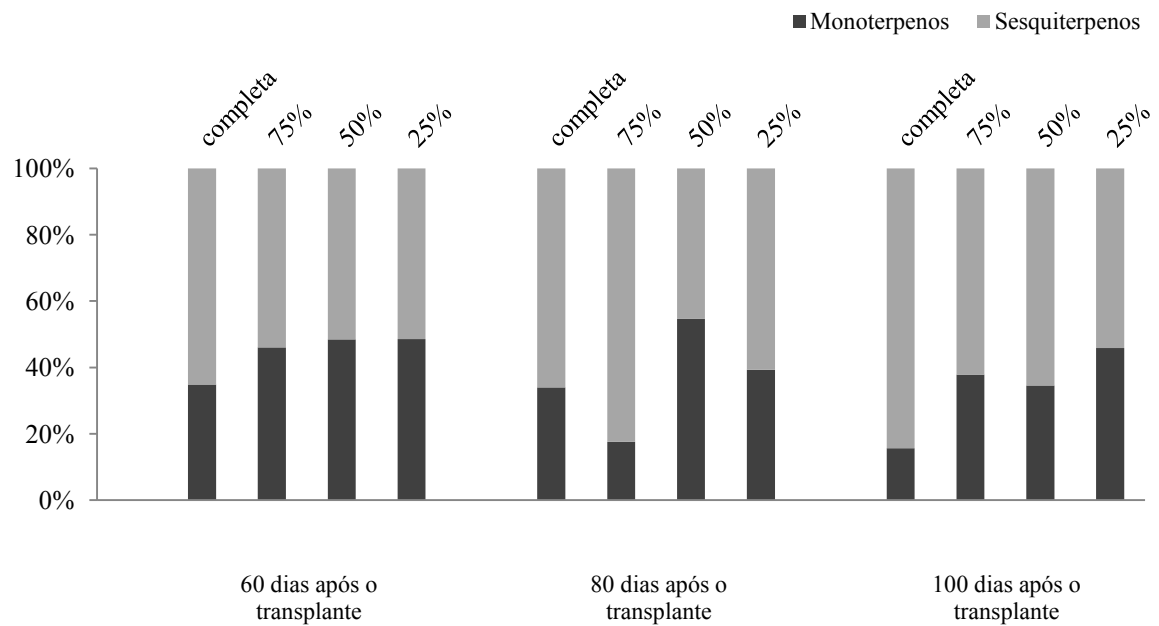


Figura 1. Teor (%) de monoterpenos e sesquiterpenos do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* cultivado em solução nutritiva 100% (completa), 75%, 50% e 25%. Médias normalizadas das colheitas realizadas aos 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa de mestrado concedida e a todos os profissionais do Laboratório de Produtos Naturais do Centro de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas/SP – Brasil, pelo apoio na realização das análises aqui descritas.

Referências

1. D.R. Hoagland and D.I. Arnon, The water-culture method for growing plants without soil. *Circ./Calif. Agric. Exp. Stn.*, **347**, 1-32 (1950).
2. APG III, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.*, **161**, 105-121 (2009).
3. V.C. Souza and H. Lorenzi, Lamiaceae. In: Souza VC, Lorenzi H (eds.) *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III*, pp.644-649. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 3ed. (2012)

4. Ietswaart JH A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). The Hague/Boston/London, Leiden Univ. Press (1980).
5. S. Kokkini and D. Vokou, *Carvacrol rich plants in Greece*. Flavour Fragr. J., **4**, 1-7 (1989).
6. H. Trindade, *Molecular biology of aromatic plants and spices. A review*. Flavour Fragr. J., **25**, 272-281 (2010).
7. L.F. D'Antuono, G.C. Galletti and P. Bocchini, Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a north mediterranean area (Liguria Region, Northern Italy). Ann. Bot., **86**, 471-478 (2000).
8. G.D. Kaniyas; C. Souleles; A. Loukis and E. Philotheou-Panou, *Trace elements and essential oil composition in chemotypes of the aromatic plant Origanum vulgare*. J. Radioanal. Nucl. Chem., **227**, n.1-2, 23-29 (1998).
9. A.C. Figueiredo and M.G. Miguel, *Aromatic plants, spices and volatiles in food and beverages*. Flavour Fragr. J., **25**, 251-252 (2010).
10. E. Ormenõ, C. Fernandez, A. Bousquet-Mélou, S. Greff, E. Morin, C. Robles, B. Vila and G. Bonin, Monoterpene and sesquiterpene emissions of three Mediterranean species through calcareous and siliceous soils in natural conditions. Atmospheric Environment, **41**, 629-639 (2007).
11. S. Kokkini, S.; R. Karousou, R. and D. Vokou, *Pattern of geographic variation of Origanum vulgare trichomes and essential oil content in Greece*. Biochem. Syst. Ecol., **22**, n.5, 517-528 (1994).
12. D. Mockute; G. Bernotiene; A. Judzentiene, *The essential oil of Origanum vulgare L. ssp. vulgare growing wild in Vilnius district (Lithuania)*. Phytochemistry, **57**, 65-69 (2001).
13. L. Gobbo-Neto and N.P. Lopes, *Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários*, Quim. Nova, **30**, n.2, 374-381 (2007).
14. H. Van den Dool and D.J. Kratz, *A generalization of the relation index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography*. J. Chromatogr., **11**, 463-467 (1963).
15. D.F. Ferreira, SISVAR: a computer statistical analysis system. Ciênc. Agrotec., **35**, 1039-1042 (2011).
16. D. Mockute, G. Bernotiene and A. Judzentiene, *The b-ocimene chemotype of essential oils of the inflorescences and the leaves with stems from Origanum vulgare ssp. vulgare growing wild in Lithuania*. Biochem. Syst. Ecol., **31**, 269-278 (2003).
17. J.C. Chalchat and B. Pasquier, *Morphological and chemical studies of origanum clones: Origanum vulgare L. ssp. vulgare*. J. Essent. Oil Res., **10**, 119-125 (1999).

18. M. Melegari; F. Severi; M. Bertoldi; S. Benvenuti; G. Circetta; I.M. Fortunato; A. Blianchi; C. Leto and A. Carrubba, *Chemical characterization of essential oils of some Origanum vulgare L. subspecies of various origin*. Rivista Italiana EPPOS, **16**, 21–29 (1995).
19. T.R. Duhl and D. Helmig, A. Guenther, Sesquiterpene emissions from vegetation: a review. Biogeosciences, **5**, 761-777 (2008).
20. J.R.G.S. Almeida; R. Facanali; M.A.R. Vieira; M.O.M. Marques; A.S.S.C. Lúcio; E.O. Lima; M.F. Agra and J.M. Barbosa-Filho, *Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Essential Oils of Duguetia gardneriana Mart. and Duguetia moricandiana Mart. (Annonaceae)*. J. Essent. Oil Res., **22**, 275-278 (2010).
21. S.R. Grattan and C.M. Grieve, *Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops*. Sci. Hortic. (Amsterdam), **78**, 127-157 (1999).
22. R.P. Adams. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Plub. Corp., Carol Stream, IL (1995).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alguns estudos avaliaram as propriedades farmacológicas dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. em ensaios biológicos. Nesses estudos, de maneira geral, não são informadas as subespécies a partir das quais os óleos foram extraídos. A espécie *O. vulgare* L. taxonomicamente apresenta seis subespécies, que apresentam óleos essenciais com composições químicas distintas, caracterizando diferença na qualidade e função desses óleos.

No presente estudo, as plantas não atingiram a fase reprodutiva durante o tempo de cultivo em casa de vegetação, e dessa forma, sem as inflorescências, a identificação da subespécie se tornou um problema, que pode ser solucionado com a avaliação da composição do óleo extraído e revisão de literatura, o que esclareceu tratar-se da espécie *Origanum vulgare* L. e subespécie *vulgare*.

Além disso, poucos trabalhos avaliaram a influência da nutrição mineral no metabolismo primário e na síntese de metabólitos secundários, produzidos em resposta a esse fator. Variações ambientais podem influenciar esses metabólitos, que são produzidos de acordo com as necessidades da planta. Dessa forma, a avaliação de variáveis fisiológicas que expressam aspectos dos metabolismos primário e secundário pode ser importante para garantir o cultivo de planta mais produtivas e resistentes, visando, também maiores teores dos compostos majoritários desejados.

Nesse estudo, as plantas de orégano apresentaram melhor desenvolvimento quando cultivadas em solução nutritiva menos concentrada (25 e 50%). As plantas cultivadas com solução 25% apresentaram a menor capacidade antioxidante, o que sugere que nessas condições não estivessem submetidas a estresse nutricional, por excesso de nutrientes. Já as plantas cultivadas com solução 50% apresentaram maior potencial antioxidante.

Embora a solução nutritiva mais concentrada (75 e 100%) não tenha sido benéfica para o desenvolvimento da espécie, as plantas apresentaram aumento de seu potencial antioxidante. A composição química do óleo essencial dessas plantas revelou aumento de sesquiterpenos. O desenvolvimento das plantas cultivadas com solução 100% foi inibido em relação à demais, o que sugere estresse causado por excesso de nutrientes, o que pode ter levado à maior produção de antioxidantes para a defesa contra radicais livres.

Por fim, sugere-se que plantas de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* sejam cultivadas em solução 50% para que apresentem desenvolvimento satisfatório e possibilitem estudos de prospecção de componentes com atividades biológicas e teores de antioxidantes de interesse para o homem, sem necessidade de gastos excessivos de nutrientes para o desenvolvimento da espécie.

CONCLUSÕES

O cultivo de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, em solução nutritiva com diferentes concentrações de nutrientes permite concluir que:

1. A solução 100% (completa) atrasou, ou mesmo inibiu o desenvolvimento da espécie, enquanto as menores concentrações 25% e 50% estimularam.

2. Os índices fisiológicos foram influenciados pela concentração da solução nutritiva e as plantas cultivadas com soluções 25% e 50% apresentaram melhor área foliar útil para a fotossíntese, eficiência fotossintética, translocação de matéria orgânica e crescimento com base em material pré-existente.

3. De maneira geral, plantas cultivadas com soluções 25% e 50% apresentaram melhores resultados de trocas gasosas, com melhor assimilação de CO₂.

4. Plantas cultivadas com solução 25% apresentaram o menor potencial antioxidante durante o desenvolvimento, o que sugere que nessas condições não estiveram submetidas a estresse nutricional por excesso de nutrientes.

5. De maneira geral, os compostos majoritários do óleo essencial apresentaram influência da concentração da solução nutritiva e da época de colheita. O aumento dos teores de sesquiterpenos nas plantas cultivadas em soluções mais concentradas (100% e 75%) sugere possível estresse causado pelo aumento dos nutrientes.

REFERÊNCIAS

-
- AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, p.239-244, 2011.
- ANTUNES, M.D.C.; CAVACO, A.M. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragr. J.**, v.25, p.351-356, 2010.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.55, p.373-399, 2004.
- APG III. Na update of Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Bot. J. Linn. Soc.**, v.161, p.105-121, 2009.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chem. Toxicol.**, v.46, p.446-475, 2008.
- BARTLEY, G.E.; SCOLNIK, P.A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. **Plant Cell**, v.7, p.1027-1038, 1995.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. 2.ed. Jaboticabal: Fundação Nacional de Ensino e Pesquisa, 2003. 41p.
- BOZIN, B.; NEDA MIMICA-DUKIC, N.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.5, p.1822-1828, 2006.
- BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidante activity. **J. Food Sci. Technol.**, v.28, p.25-30, 1995.
- COLEY, P.D.; BRYANT, J.P. ; CHAPIN, F.S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, v.230, n.4728, p.895-899, 1985
- D'ANTUONO, L.F. ; GALLETTI, G.C. ; BOCCHINI, P. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a north mediterranean area (Liguria Region, Northern Italy). **Ann. Bot.**, v.86, n.3, p.471-478, 2000.
- DIXON, R.A.; ARNTZEN, C.J. Transgenic plant technology entering the era of metabolic engineering. **Trends in biotechnol.**, v.15, p.441-444, 1997.

- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J. Appl. Microbiol.**, v.88, p.308-316, 2000.
- FIGUEIREDO, A.C.; MIGUEL, M.G. Aromatic plants, spices and volatiles in food and beverages. **Flavour Fragr. J.**, v.25, p.251-252, 2010.
- FRANZ, C.; BASER, K.H.C.; WINDISCH, W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a European perspective. A review. **Flavour Fragr. J.**, v.25, p.327-340. 2010.
- GHARRAS, H. E. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.44, p.2512-2518, 2009.
- GRATTAN, S.R.; GRIEVE, C.M. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. **Sci. Hortic. (Amsterdam)**, v.78, p.127-157, 1999.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circ./Calif. Agric. Exp. Stn.**, v.347, p.1-32, 1950.
- HUNT, S. Measurements of photosynthesis and respiration in plants. **Physiol. Plant.**, v.117, p.314-325, 2003.
- IETSWAART, J.H. **A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae)**. Leiden: Leiden University Press, 1980. 153p. (Leiden Botanical Series, 4).
- KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agricul. Food Chem.**, v.47, p.3954-3962, 1999.
- KANIAS, G.D.; SOULELES, C.; LOUKIS, A.; PHILOTHEOU-PANOU, E. Trace elements and essential oil composition in chemotypes of the aromatic plant *Origanum vulgare*. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v.227, n.1-2, p.23-29, 1998.
- KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; VOKOU, D. Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.22, n.5, p.517-528, 1994.
- KOKKINI, S.; VOKOU, D. Carvacrol rich plants in Greece. **Flavour Fragr. J.**, v.4, p.1-7, 1989.
- LANGE, B.M.; AHKAMI, A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes – current status and future opportunities. **Plant Biotechnol. J.**, v.11, p.169-196, 2013.
- LOCARNO, M.; FOCHI, C.G. ; PAIVA, P.D.O. Influência da adubação silicatada no teor de clorofila em folhas de roseira. **Ciênc. Agrotec.**, v.35, n.2, p.287-290, 2011.

- LOLIGER, J. Use of antioxidants in food. In: ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B. (Eds.). **Free radicals and food additives**. Londres: Taylor & Francis, 1991. p.121-150.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- LOVKOVA, M.Ya.; BUZUK, G. N.; SOKOLOVA, S. M.; KLIMENT'EVA, N. I. Chemical features of medicinal plants. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v.37, n.3, p.229-237, 2001.
- MAIRAPETYAN, S.K. Aromatic plant culture in open-air hidroponics. **Acta Hortic.**, v.502, p.33-36, 1999.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.
- MARTINEZ, H.E.P. **O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa**. 3.ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 2002. 61p.
- MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.3, p.639-644, 2006.
- MOCKUTE, D.; BERNOTIENE, G.; JUDZENTIENE, A. 2001. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). **Phytochemistry**, v.57, p.65-69, 2001.
- MOCKUTE, D.; BERNOTIENE, G.; JUDZENTIENE, A. The β -ocimene chemotype of essential oils of the inflorescences and the leaves with stems from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* growing wild in Lithuania. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.31, p.269-278, 2003.
- NEILSON, E.H.; GOODGER, J.Q.D.; WOODROW, I.E.; MØLLER B.L. Plant chemical defense: at what cost? **Trends Plant Sci.**, in press, 2013.
- PICHERSKY, E.; GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends Plant Sci.**, v.5, p.439-445, 2000.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2007. 856p.
- RESH, H.M. **Hydroponic food production: a definitive guidebook for the advanced home gardener and the commercial hydroponic grower**. 5.ed. Santa Barbara: Woodbridge, 1995.

- SCALZO, R. Lo. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. **Food Chem.**, v.107, p.40-43, 2008.
- SCHILMILLER, A.L.; LAST, R.L., PICHERSKY, E. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. **Plant J.**, v.54, p.702-711, 2008.
- SCHWAB, W. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? **Phytochemistry**, v.62, p.837-849, 2003.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Lamiaceae. In: SOUZA, V.C.; LORENZI, H. (Eds.). **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III.** 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. p.644-649.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719p.
- TRINDADE, H. Molecular biology of aromatic plants and spices. A review. **Flavour Fragr. J.**, v.25, p.272-281, 2010.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.39, p.44-84, 2007.
- VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.43, p.526-531, 2008.
- WANG, Y.; FREI, M. Stressed food – The impact of abiotic environmental stresses on crop quality. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v.141, p.271-286, 2011.



Figura 1. Início do cultivo em casa de vegetação. Plantas recém-transplantadas.



Figura 2. Plantas aos 60 dias após o transplante.



Figura 2. Plantas aos 60 dias após o transplante, cultivadas em solução 100% (completa) de Hoagland e Arnon (1950).



Figura 2. Plantas aos 60 dias após o transplante, cultivadas em solução 25% e 50% (completa) de Hoagland e Arnon (1950).

Tabela 1. Análise de variância e comparação entre médias de massa seca de raízes de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, em g, cultivado em solução nutritiva completa (100%) e diluída a 75%, 50% e 25%, nas cinco colheitas realizadas aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Análise de Variância (Teste F)						
Tratamento	Colheita		Interação (Tratamento x Colheita)			
2,41	15,32*		1,16			

* significância ao nível de $p < 0,05$

Comparação entre Médias (Teste Tukey)						
Tratamento	Colheita (dias após o transplante)					Média dos Tratamentos
	1 ^a (20)	2 ^a (40)	3 ^a (60)	4 ^a (80)	5 ^a (100)	
100%	0,32	0,69	1,48	1,44	3,75	1,54 a
75%	0,33	0,91	1,56	1,47	2,25	1,30 a
50%	0,36	0,95	2,32	3,82	3,50	2,19 a
25%	0,33	1,05	2,32	3,35	2,62	1,93 a
Média das Colheitas	0,34 C	0,90 BC	1,92 AB	2,52 A	3,03 A	

** Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. As letras minúsculas nas colunas comparam médias dos tratamentos dentro das épocas de colheita e as maiúsculas nas linhas comparam médias das épocas de colheita em cada tratamento.

Tabela 2. Análise de variância e comparação entre médias de massa seca de caule de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, em g, cultivado em solução nutritiva completa (100%) e diluída a 75%, 50% e 25%, nas cinco colheitas realizadas aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Análise de Variância (Teste F)						
Tratamento	Colheita		Interação (Tratamento x Colheita)			
3,69	20,49*		0,90			

* significância ao nível de $p < 0,05$

Comparação entre Médias (Teste Tukey)						
Tratamento	Colheita (dias após o transplante)					Média dos Tratamentos
	1 ^a (20)	2 ^a (40)	3 ^a (60)	4 ^a (80)	5 ^a (100)	
100%	0,14	0,37	0,95	1,75	3,93	1,43 a
75%	0,17	0,57	1,54	1,84	3,74	1,57 a
50%	0,14	0,63	2,64	5,23	4,90	2,71 a
25%	0,10	0,91	2,97	4,38	4,48	2,57 a
Média das Colheitas	0,14 D	0,62 CD	2,02 BC	3,30 AB	4,26 A	

** Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. As letras minúsculas nas colunas comparam médias dos tratamentos dentro das épocas de colheita e as maiúsculas nas linhas comparam médias das épocas de colheita em cada tratamento.

Tabela 3. Análise de variância e comparação entre médias de massa seca de folhas de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, em g, cultivado em solução nutritiva completa (100%) e diluída a 75%, 50% e 25%, nas cinco colheitas realizadas aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Análise de Variância (Teste F)					
Tratamento	Colheita		Interação (Tratamento x Colheita)		
4,46*	34,08*		2,99*		

* significância ao nível de $p < 0,05$

Comparação entre Médias (Teste Tukey)					
Tratamento	Colheita (dias após o transplante)				
	1 ^a (20)	2 ^a (40)	3 ^a (60)	4 ^a (80)	5 ^a (100)
100%	0,64 Ba	1,59 Ba	3,26 Ba	4,08 Bb	11,87 Aa
75%	0,59 Ba	2,77 Ba	5,11 ABa	4,27 Bb	9,82 Aa
50%	0,69 Da	2,31 CDa	6,88 BCa	14,69 Aa	9,60 ABa
25%	0,58 Ca	3,08 BCa	8,44 ABa	9,16 Ab	11,10 Aa

** Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. As letras minúsculas nas colunas comparam médias dos tratamentos dentro das épocas de colheita e as maiúsculas nas linhas comparam médias das épocas de colheita em cada tratamento.

Tabela 4. Análise de variância e comparação entre médias de massa seca total de *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, em g, cultivado em solução nutritiva completa (100%) e diluída a 75%, 50% e 25%, nas cinco colheitas realizadas aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Análise de Variância (Teste F)					
Tratamento	Colheita		Interação (Tratamento x Colheita)		
4,48*	30,97*		2,11*		

* significância ao nível de $p < 0,05$

Comparação entre Médias (Teste Tukey)					
Tratamento	Colheita (dias após o transplante)				
	1 ^a (20)	2 ^a (40)	3 ^a (60)	4 ^a (80)	5 ^a (100)
100%	1,11 Ba	2,66 Ba	5,69 Ba	7,27 Bb	19,57 Aa
75%	1,09 Ba	4,25 Ba	8,22 ABa	7,59 ABb	15,82 Aa
50%	1,20 Da	3,90 CDa	11,85 BCa	23,74 Aa	18,00 ABa
25%	1,03 Ca	5,04 BCa	13,74 ABa	16,89 Aa	18,21 Aa

** Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. As letras minúsculas nas colunas comparam médias dos tratamentos dentro das épocas de colheita e as maiúsculas nas linhas comparam médias das épocas de colheita em cada tratamento.

Tabela 5. Análise de variância e comparação entre médias de área foliar de *Origanum Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*, em dm², cultivado em solução nutritiva completa (100%) e diluída a 75%, 50% e 25%, nas cinco colheitas realizadas aos 20, 40, 60, 80 e 100 dias após o transplante.

Análise de Variância (Teste F)					
Tratamento	Colheita		Interação (Tratamento x Colheita)		
2,33	19,14*		1,92*		

* significância ao nível de $p < 0,05$

Comparação entre Médias (Teste Tukey)					
Tratamento	Colheita (dias após o transplante)				
	1 ^a (20)	2 ^a (40)	3 ^a (60)	4 ^a (80)	5 ^a (100)
100%	103,98 Ba	241,82 Ba	484,41 Ba	513,16 Bb	1613,84 Aa
75%	119,58 Ba	441,92 ABa	789,91 ABa	621,89 ABb	1190,62 Aa
50%	114,79 Ca	464,66 BCa	970,88 ABa	1764,61 Aa	1256,15 ABa
25%	89,94 Ba	560,85 ABa	989,23 Aa	1043,40 Aab	1073,10 Aa

** Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. As letras minúsculas nas colunas comparam médias dos tratamentos dentro das épocas de colheita e as maiúsculas nas linhas comparam médias das épocas de colheita em cada tratamento.