

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**METABOLISMO, DESENVOLVIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA  
DE *Varronia curassavica* Jacq. EM FUNÇÃO DA SUPRESSÃO DA  
IRRIGAÇÃO**

**CRISTIANE DE OLIVEIRA BOLINA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP – Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU - SP  
Maio 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**METABOLISMO, DESENVOLVIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA  
DE *Varronia curassavica* Jacq. EM FUNÇÃO DA SUPRESSÃO DA  
IRRIGAÇÃO**

**CRISTIANE DE OLIVEIRA BOLINA**

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques

Co-orientador: Dr. José Abramo Marchese

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP – Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU - SP  
Maio 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

B689m Bolina, Cristiane de Oliveira, 1985-  
Metabolismo, desenvolvimento e composição química de *Varronia curassavica* Jacq. em função da supressão da irrigação / Cristiane de Oliveira Bolina. - Botucatu : [s.n.], 2015  
xiv, 89 f. : fots. color.; grafos., ils., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2015  
Orientador: Marcia Ortiz Mayo Marques  
Coorientador: José Abramo Marchese  
Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais - Desidratação (Hídrica). 2. Essências e óleos essenciais - Uso terapêutico. 3. Ecofisiologia. I. Marques, Marcia Ortiz Mayo. II. Marchese, José Abramo. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** "METABOLISMO, DESENVOLVIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA  
DE *Varronia curassavica* Jacq. EM FUNÇÃO DA SUPRESSÃO DA  
IRRIGAÇÃO"

**AUTORA:** CRISTIANE DE OLIVEIRA BOLINA

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. JOSÉ ABRAMO MARCHESE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA  
(HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos / Instituto Agrônomo de  
Campinas

Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM

Dep de Horticultura / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Prof. Dr. FERNANDO BROETTO

Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. HUMBERTO RIBEIRO BIZZO

EMBRAPA - Rio de Janeiro/RJ

Prof. Dr. JOSÉ BALDIN PINHEIRO

Depto Genética / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Usp

Data da realização: 15 de maio de 2015.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

CRISTIANE DE OLIVEIRA BOLINA, filha de Elaine José de Oliveira Bolina e Daniel Francisco Bolina, nasceu no dia 23 de maio de 1985, em Itumbiara (GO).

De fevereiro de 2005 a julho de 2008 cursou Licenciatura Plena em Biologia pelo Instituto Luterano de Ensino Superior de Itumbiara (ILES/ULBRA).

Em março de 2009, iniciou o Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus de Pato Branco, sob a orientação do Dr. José Abramo Marchese, submetendo-se a defesa de dissertação em 25 de fevereiro de 2011.

Em agosto de 2011, iniciou o curso de Doutorado na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de Botucatu. Entre outubro de 2014 e março de 2015 realizou estágio sanduíche na University of Miami, sob a orientação do Dr. Leonel da Silveira Lobo O'Reilly Sternberg. Em 15 de maio de 2015 submeteu-se a defesa de tese.

Aos meus pais, Daniel e Elaine  
As minhas sobrinhas, Sophia e Beatriz  
por tornarem minha caminhada mais leve,

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agronômicas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pelo comprometimento com o ensino e a pesquisa no Brasil;

Ao Programa de Pós-graduação em Horticultura pela oportunidade de cursar o doutorado;

À CAPES pela concessão das bolsas de estudos de doutorado e doutorado-sanduíche;

À professora Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques pela orientação tranquila, amizade e confiança, meu profundo respeito e admiração;

Ao professor Dr. José Abramo Marchese pela co-orientação e por participar da minha jornada desde o mestrado;

Ao professor Dr. Fernando Broetto por disponibilizar equipamentos, laboratório, reagentes e pela contribuição em todas as fases do trabalho;

Ao professor Dr. Filipe Bonfim pela amizade, colaboração nas análises estatísticas e por compartilhar seus conhecimentos;

Aos professores do departamento de Horticultura pelos ensinamentos transmitidos, em especial ao professor Dr. Lin Chau Ming, exemplo de sabedoria e humildade, pelos anos dedicados ao estudo de plantas medicinais;

À professora Martha Mischan (IB/Unesp) pelo auxílio no planejamento estatístico.

Ao professor Dr. Walter Siqueira do Instituto Agrônomo (IAC) pela disponibilidade e auxílio no planejamento para implantação do experimento;

Ao Dr. Ílio Montanari Jr. (CPQBA) por fornecer sementes para a realização de pré-testes.

Ao professor Dr. Leonel Sternberg por ter me recebido em seu laboratório durante o período de doutorado-sanduíche na Universidade de Miami, pela colaboração, paciência e por ajudar a superar minhas limitações;

Aos funcionários do IAC Sr. Toninho, Sandrinha, Dani e João (Grãos e Fibras) por terem contribuído com o trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica (IAC) Camila, Paulo, Maria, Roselaine e Bia pelo auxílio e convivência harmoniosa;

Aos amigos Dayanne e Diogo pela imensa contribuição na avaliação do experimento e pela companhia desde as 03h30min da manhã. A ajuda de vocês foi fundamental;

Às amigas do Laboratório de Bioquímica Dayanne, Érica e Renata pela ajuda nas análises e pela agradável convivência;

Aos colegas da pós-graduação. Em especial aos que se tornaram amigos: Elza, Alexandre, Jamile, Luis Lessi, Almecina, Sthefani, Renê e Daniel Garcia pelo apoio e por todos os momentos descontraídos que vivemos juntos;

Aos amigos que encontrei em Botucatu Erich Neto, João Marinho (Jotta), Paulo Bassetto e Claudia Berbert. Agradeço especialmente ao Jotta pela alegre companhia, cumplicidade e por cuidar tão bem de mim;

À minha amiga Simone por todos os momentos vividos no apartamento 21 do Bloco Caravelos, um pedacinho de Goiás no centro de Campinas;

Aos meus familiares por entenderem a minha escolha de percorrer o longo caminho da pós-graduação e estarem presentes mesmo com a imensa distância física;

Ao meu noivo pelo carinho e paciência, por compreender a minha ausência e apoiar todas as minhas decisões;

Às minhas sobrinhas por encherem minha vida de amor, alegria e esperança, me abastecem de coragem;

Aos meus queridos pais pelo apoio incondicional e por jamais medirem esforços para a conclusão dos meus estudos;

Ao maior de todos os mestres, Deus, pelo dom precioso da vida, por estar ao meu lado diariamente me concedendo saúde e a força necessária para sempre seguir em frente.

A todos sou imensamente grata!



“E é tão bonito quando a gente entende  
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá  
E é tão bonito quando a gente sente  
Que nunca está sozinho por mais que pense estar  
É tão bonito quando a gente pisa firme  
Nessas linhas que estão nas palmas de nossas mãos  
É tão bonito quando a gente vai à vida  
Nos caminhos onde bate, bem mais forte o coração”

(Caminhos do coração, Gonzaguinha)

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. OBJETIVOS.....	7
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
5.1. <i>Varronia curassavica</i> Jacq.....	8
5.1.1. Interesse comercial pela espécie.....	11
5.2. Óleos essenciais.....	11
5.3 Deficiência hídrica e sua relação com o metabolismo especializado.....	14
5.4. Ecofisiologia vegetal.....	15
5.4.1. Mecanismos de resposta à deficiência hídrica.....	17
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
6.1. Conteúdo relativo de água.....	24
6.2. Teor relativo de clorofila.....	25
6.3. Trocas gasosas.....	25
6.4. Análises de características biométricas.....	26
6.4.1. Análises de crescimento.....	26
6.5. Análises do óleo essencial.....	27
6.6. Análise de isótopos estáveis.....	28
6.7. Análises bioquímicas.....	29
6.7.1. Coleta e armazenamento do material vegetal.....	29
6.7.2. Procedimentos para obtenção do extrato bruto.....	29
6.7.2.1. Determinação do teor de açúcares totais.....	30
6.7.2.2. Determinação do teor de proteínas solúveis totais.....	30
6.7.2.3. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)...	31
6.7.2.4. Atividade da enzima Peroxidase (POX; EC 1.11.1.7).....	32
6.7.2.5. Determinação do teor de L-prolina.....	32

6.7.2.6. Determinação da peroxidação de lipídeos.....	33
6.8. Métodos de análise dos resultados.....	34
7. RESULTADOS OBTIDOS.....	35
7.1. Análises de características biométricas.....	35
7.1.1. Análises de crescimento.....	45
7.2. Trocas gasosas.....	46
7.3. Teor relativo de clorofila.....	50
7.4. Conteúdo relativo de água.....	50
7.5. Análises bioquímicas.....	52
7.6. Isótopos estáveis.....	57
7.7. Análises do óleo essencial.....	61
8. CONCLUSÃO.....	70
9. REFERÊNCIAS.....	71
10. APÊNDICE.....	83

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *V. curassavica* em habitat natural. Foto: Cristiane Bolina. (Porto Seguro, Bahia, Brasil). ..... 9
- Figura 2.** Folhas e flores de *V. curassavica*. Foto: Cristiane Bolina. (Porto Seguro, Bahia, Brasil). ..... 10
- Figura 3.** Estruturas químicas do  $\alpha$ -humuleno e (*E*)-cariofileno. .... 13
- Figura 4.** Taxa de assimilação líquida, taxa de crescimento relativo e metabolismo especializado, em resposta a mudanças na disponibilidade de recursos (Adaptado de Herms, Mattson, 1992). Fonte: Marchese, Figueira (2005). ..... 14
- Figura 5.** Fatores abióticos causadores de estresse em plantas (Adaptado de Ramakrishna; Ravishankar, 2011). ..... 16
- Figura 6.** A- Instalação do experimento: vasos colocados sobre bandejas em casa de vegetação. B- Transplante das mudas para os vasos plásticos. .... 22
- Figura 7.** A- Plantas no momento da supressão da irrigação. B- Avaliação do  $\Psi_w$  utilizando câmara de pressão. .... 23
- Figura 8.** Corte dos discos foliares para avaliação do conteúdo relativo de água (CRA). .... 24
- Figura 9.** Avaliação do teor relativo de clorofila com o auxílio de clorofilômetro. .... 25
- Figura 10.** Análise das trocas gasosas com o uso de analisador de gases portátil. .... 26
- Figura 11.** Análise da concentração de proteínas solúveis totais presentes nos extratos. .... 31
- Figura 12.** Análise do teor de L-prolina. .... 33
- Figura 13.** Altura e área foliar de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 37
- Figura 14.** Massa de folhas frescas (MFF), massa de caules frescos (MCF), massa total fresca (MTF) e volume de raiz (VR) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 41
- Figura 15.** Massa de caules secos (MCS), massa de raízes secas (MRS) e massa total seca (MTS) de plantas de *Varronia curassavica* submetida à supressão da irrigação, em função dos

potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 44

**Figura 16.** Razão de área foliar de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 46

**Figura 17.** Taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática (gs) e taxa de transpiração (E) em plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 49

**Figura 18.** Conteúdo relativo de água (CRA) em discos foliares de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 51

**Figura 19.** Teores de proteínas solúveis totais (PT), açúcares totais (AT), prolina (PR) e peroxidação de lipídeos (PL) em tecidos foliares de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 55

**Figura 20.** Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em tecidos foliares de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 57

**Figura 21.** Porcentagem de nitrogênio total (N, %) e razão isotópica de nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) e carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em folhas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 59

**Figura 22.** Rendimento de óleo essencial de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 62

**Figura 23.** Rendimento de óleo essencial por planta (ROE, %), massa do óleo essencial por planta e hectare (MOE, g) e massa foliar seca por planta e hectare (MFS, g e kg) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. ....64

**Figura 24.** Padrão de divergência química entre os  $\Psi_w$ , definido pela Análise de Componentes Principais com base nas sete substâncias com maior proporção relativa média no óleo essencial de *Varronia curassavica*. Campinas, São Paulo, Brasil. ....68

**Figura 25.** Dendrograma resultante da análise de agrupamento para os quatro tratamentos avaliados, a partir da proporção relativa média das sete substâncias mais abundantes no óleo essencial de *Varronia curassavica*, utilizando a Distância Euclidiana e a análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica. .... 69

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características químicas do solo utilizado nos vasos com *Varronia curassavica* Campinas, São Paulo, 2014. .... 22
- Tabela 2.** Resumo da análise de variância da regressão para altura (AL, m), diâmetro de caule (DC, cm), número de folhas (NF, un) e área foliar (AF, cm<sup>2</sup>) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 36
- Tabela 3.** Resumo da análise de variância da regressão para massa das folhas frescas (MFF, g), massa de caules frescos (MCF, g), massa de raízes frescas (MRF, g), massa total fresca (MTF, g) e volume de raiz (VR, cm<sup>3</sup>) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 39
- Tabela 4.** Resumo da análise de variância da regressão para massa das folhas secas (MFS, g), massa de caules secos (MCS, g), massa de raízes secas (MRS, g) e massa total seca (MTS, g) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 43
- Tabela 5.** Resumo da análise de variância da regressão para as análises de crescimento: razão de massa foliar (RMF, g cm<sup>-2</sup>) e razão de área foliar (RAF, cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 45
- Tabela 6.** Resumo da análise de variância da regressão para taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> (A, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), condutância estomática (gs, mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>, μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>), taxa de transpiração (E, mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), eficiência no uso de água (EUA, mmol mol<sup>-1</sup>) e eficiência instantânea da carboxilação (EiC, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) em plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 48
- Tabela 7.** Resumo da análise de variância da regressão para teor relativo de clorofila (SPAD) em folhas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 50
- Tabela 8.** Resumo da análise de variância da regressão para conteúdo relativo de água (CRA, %) em discos foliares de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 51

**Tabela 9.** Resumo da análise de variância da regressão dos teores de proteínas solúveis totais (PT,  $\mu\text{g mL}^{-1}$  alíquota), açúcares totais (AT,  $\text{mg AT g}^{-1}$  MF), prolina (PR,  $\text{nmol g}^{-1}$  MF), peroxidação de lipídeos (PL,  $\text{mol de MDA g}^{-1}$  MF), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD,  $\text{U SOD } \mu\text{g Prot.}^{-1}$ ) e peroxidase (POX,  $\mu\text{Kat mg Prot}^{-1}$ ) em tecidos foliares de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 54

**Tabela 10.** Resumo da análise de variância da regressão para carbono total (C, %), nitrogênio total (N, %) e para as razões isotópicas de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) em folhas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 58

**Tabela 11.** Resumo da análise de variância da regressão para massa foliar seca (g) e rendimento médio de óleo essencial (%) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 61

**Tabela 12.** Composição química média dos óleos essenciais (%) de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014. .... 66



METABOLISMO, DESENVOLVIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Varronia curassavica* Jacq. EM FUNÇÃO DA SUPRESSÃO DA IRRIGAÇÃO. Botucatu, 2015. 103p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: CRISTIANE DE OLIVEIRA BOLINA

Orientadora: MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Coorientador: JOSÉ ABRAMO MARQUESE

## 1. RESUMO

Erva baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) é uma planta medicinal nativa do Brasil. O óleo essencial vem sendo utilizado pela indústria farmacêutica por sua atividade anti-inflamatória, atribuída ao  $\alpha$ -humuleno. O presente estudo objetivou avaliar as respostas fisiológicas, químicas e bioquímicas de plantas de *V. curassavica*, em função da supressão da irrigação. Foram utilizadas mudas micropropagadas da espécie. Os tratamentos foram representados pelo controle (irrigado diariamente) e por três níveis de deficiência hídrica, todos expressos pelo potencial de água no xilema da folha ( $\Psi_w$ ): T1 - controle ( $\Psi_w \sim -0,3$  MPa), T2 -  $\Psi_w \sim -1,0$  MPa; T3 -  $\Psi_w \sim -1,7$  MPa e T4 -  $\Psi_w \sim -2,5$  MPa. As plantas foram avaliadas quanto às trocas gasosas, teor relativo de clorofila, conteúdo relativo de água, análises de características biométricas, bioquímicas, estabilidade isotópica e composição química dos óleos essenciais. Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão. Na análise de regressão, as equações que melhor se ajustaram aos dados foram escolhidas com base na significância dos coeficientes de regressão e no maior coeficiente de determinação. Aos resultados de composição química dos óleos essenciais foi aplicada análise multivariada. Observou-se redução das variáveis biométricas altura da planta, área foliar e rendimento das massas frescas de folha, caule e total, em função da supressão hídrica. As variáveis de trocas gasosas não foram influenciadas pelos potenciais hídricos com supressão da irrigação, apenas o tratamento controle diferiu estatisticamente dos demais. O conteúdo relativo de água decresceu linearmente em relação aos diferentes níveis de potencial hídrico, apresentando redução de proximadamente 80%. A espécie *V. curassavica* apresenta mecanismo fotossintético do tipo  $C_3$ . O maior rendimento de óleo essencial (0,18%) foi

observado em plantas submetidas ao menor potencial hídrico (-2,5 MPa). O limite de atividade da enzima superóxido dismutase e o maior acúmulo de prolina foram sob -1,7 MPa. A supressão da irrigação foi eficiente no aumento da produtividade do óleo essencial de *V. curassavica*, sem provocar perdas no acúmulo de fitomassa. Não se observou diferença quantitativa nas substâncias dos óleos essenciais entre os tratamentos, exceto para o  $\gamma$ -(*E*)-bisaboleno. As proporções relativas dos princípios ativos (*E*)-cariofileno (25,2%) e  $\alpha$ -humuleno (4,4%) não diferiram estatisticamente em função dos tratamentos.

---

**Palavras-chave:** *Cordia verbenacea*, erva baleeira, seca, mecanismos fisiológicos, óleo essencial,  $\alpha$ -humuleno

METABOLISM, DEVELOPMENT AND CHEMICAL COMPOSITION OF *Varronia curassavica* Jacq. ACCORDING TO IRRIGATION SUPPRESSION. Botucatu, 2015. 103p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CRISTIANE DE OLIVEIRA BOLINA

Adviser: MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Co-advisor: JOSÉ ABRAMO MARQUESE

## 2. SUMMARY

Erva baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) is a medicinal plant native to Brazil. The essential oil has been used by the pharmaceutical industry for its anti-inflammatory activity associated with  $\alpha$ -humulene. This study aimed to assess the physiological, chemical and biochemical responses of *V. curassavica* plants to irrigation suppression. It was used micropropagated seedlings. The treatments consisted of the control (daily irrigation) and three levels of water deficit, expressed by water potential in leaf xylem ( $\Psi_w$ ): T1 - control ( $\Psi_w$ :  $\sim -0.3$  MPa), T2 -  $\Psi_w \sim -1.0$  MPa; T3 -  $\Psi_w \sim -1.7$  MPa and T4 -  $\Psi_w \sim -2.5$  MPa. Plants were evaluated for gas exchange, relative chlorophyll content, relative water content, biometrics analysis, biochemical characteristics, isotopic stability and chemical composition of essential oils. The results were subjected to analysis of variance and regression. In regression analysis, the most significant equations were selected based on the significance of the regression coefficients and on the highest coefficient of determination. Multivariate analysis was applied to the results of chemical composition of essential oils. The analysis of biometric variables (plant height, leaf area, yield of fresh mass of leaf, stem and the whole plant) evidenced reduction according to irrigation suppression. Irrigation suppression showed no influence on gas exchange, only the control was statistically different from the other treatments. The relative water content decreased linearly depending on the different levels of water potential, a reduction of approximately 80%. *V. curassavica* has C3 photosynthetic mechanism. The highest oil yield (0.18%) was found in plants subjected to the lowest water potential (-2.5 MPa). The limits of the activity of superoxide dismutase and the highest proline

accumulation were found under -1.7 MPa. Suppression of irrigation was effective in increasing the yield of the essential oil of *V. curassavica* without causing losses in biomass accumulation. There was no quantitative difference in the substances of the essential oils between treatments, except for  $\gamma$ -(E)-bisabolene. The relative percentages of the active principles (E)-caryophyllene (25.2%) and  $\alpha$ -humulene (4.4%) were not different between treatments.

---

Keywords: *Cordia verbenacea*, erva baleeira, drought, physiological mechanisms, essential oil,  $\alpha$ -humulene

### 3. INTRODUÇÃO

Recentemente, várias regiões do Brasil têm enfrentado grandes e intensos períodos de seca. Pensando nisso, avanços no sentido de compreender a influência de fatores ambientais no desenvolvimento e produtividade das plantas ou que busquem o desenvolvimento de novas tecnologias de irrigação, visando economia e reaproveitamento de água, são muito importantes.

Além de investigações no âmbito das plantas destinadas a alimentação e produção de energia, as plantas medicinais e aromáticas também merecem especial atenção, pois fornecem matéria-prima para a produção de fitofármacos e cosméticos, dentre outros segmentos da indústria. Em meio às plantas medicinais com potencial para estudo, podemos destacar *Varronia curassavica* Jacq. uma das 71 espécies presentes na lista do Rénisus (2009). Nesta lista, constam as plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS).

*V. curassavica* é conhecida como erva baleeira, nativa do litoral brasileiro e encontrada principalmente entre São Paulo e Santa Catarina. Suas folhas são utilizadas na medicina popular como anti-inflamatório, analgésico e antiulcerogênico, sob a forma de chás ou infusões. O óleo essencial da planta contém  $\alpha$ -humuleno, sesquiterpeno que apresenta ação anti-inflamatória (MONTANARI JÚNIOR, 2000).

Em 2005, o Aché Laboratórios Farmacêuticos lançou no mercado o primeiro medicamento com pesquisa e desenvolvimento inteiramente realizados no Brasil, o

Acheflan<sup>®</sup>, droga anti-inflamatória produzida com o óleo essencial das folhas de *V. curassavica*, que contém entre 2,3 a 2,9% de  $\alpha$ -humuleno, e é indicada para o tratamento de tendinites crônicas e dores miofasciais (BRANDÃO et al., 2006, QUISPE-CONDORI et al., 2008).

Contudo, a qualidade da matéria-prima utilizada na produção do fitomedicamento pode variar. Michielin (2009) alerta que o conteúdo de  $\alpha$ -humuleno sofre alterações de acordo com a fonte de erva baleeira utilizada, com a maturidade da planta, com a região de colheita e com o processo de extração aplicado, o que pode afetar substancialmente sua biodisponibilidade e conseqüentemente a ação dos preparados industriais.

Informações científicas têm indicado que o aumento na produção de substâncias oriundas do metabolismo especializado, também denominado metabolismo secundário, pode ser induzido por meio do manejo e diminuição da água de irrigação, sendo que, sob deficiência hídrica moderada as espécies medicinais podem apresentar acúmulo de substâncias bioativas (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005; NASROLLAHI et al., 2014). Este aumento na produção de óleos essenciais ou na biossíntese de determinada substância foi encontrado por Marchese et al. (2010) em *Artemisia annua* L., Vazin (2013) em *Cuminum cyminum* L. e Pinto et al. (2014) em *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf..

Além disso, os efeitos prejudiciais do estresse podem ser compensados pelas plantas por meio de diversos mecanismos que operam em diferentes escalas de tempo, dependendo da natureza do estresse e dos processos fisiológicos que são afetados (LAMBERS et al., 1998).

Desta forma, avaliar e compreender as respostas metabólicas de espécies medicinais sob influência da supressão hídrica pode fornecer informações importantes sobre o manejo destas plantas em condições adversas, além de possibilitar a maior produção de substâncias de interesse.

#### 4. OBJETIVO GERAL

O presente estudo objetivou avaliar as respostas fisiológicas, químicas e bioquímicas de plantas de *Varronia curassavica*, em função da supressão da irrigação.

##### 4.1. Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos da supressão da irrigação no desenvolvimento de plantas de *V. curassavica*, a partir de caracteres biométricos;

Analisar parâmetros de trocas gasosas, como taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub>, condutância estomática, concentração intracelular de CO<sub>2</sub> e taxa de transpiração, em *V. curassavica* submetida à supressão da irrigação;

Verificar a composição isotópica de carbono (<sup>13</sup>C) e nitrogênio (<sup>15</sup>N) em folhas de *V. curassavica*, em função da supressão da irrigação;

Avaliar os efeitos da supressão da irrigação no rendimento e composição química do óleo essencial das folhas de *V. curassavica*;

Quantificar as respostas bioquímicas à supressão da irrigação em relação aos açúcares totais, proteínas solúveis totais, prolina, peroxidação de lipídeos, superóxido dismutase e peroxidase, em tecidos vegetais de *V. curassavica*.

## 5. REVISÃO DE LITERATURA

### 5.1. *Varronia curassavica* Jacq.

*Varronia curassavica* Jacq. (sinonímia: *Cordia verbenacea* DC.), pertencente à família Boraginaceae, é uma planta medicinal nativa do Brasil, que ocorre em regiões litorâneas (VAZ et al., 2006; PASSOS et al., 2007), desde o Amazonas (AKISUE et al., 1983) ao Rio Grande do Sul (MONTANARI JÚNIOR, 2000) (Figura 1). A espécie é popularmente conhecida como erva baleeira, salicina, catinga-de-barão, cordia, erva-balieira, balieira-cambará, erva-preta, maria-milagrosa, maria-preta, catinga-preta, maria-rezadeira, camarinha, camaramoneira-do-brejo, pimenteira (MONTANARI JÚNIOR, 2000; CARVALHO JÚNIOR et al., 2004; LORENZI; MATOS, 2008). Outras sinonímias botânicas são: *Cordia curassavica*, *Cordia salicina* DC., *Cordia cylindristachia*, *Lithocardium fresenii*, *Lithocardium salicinum* e *Lithocardium verbaceum* (CARVALHO JÚNIOR et al., 2004).

A parte aérea da planta possui odor forte e persistente (PASSOS et al., 2007) e que para algumas pessoas lembra o aroma de condimentos de carne, razão pela qual a planta é chamada em inglês de “maggy plant” (MONTANARI JÚNIOR, 2000).





**Figura 1.** *V. curassavica* em habitat natural. Foto: Cristiane Bolina. (Porto Seguro, Bahia, Brasil).

A espécie apresenta arbusto ereto, muito ramificado, aromático, com a extremidade dos ramos pendente e hastes revestidas por casca fibrosa, atingindo de 1,5 a 2,5 m de altura. Possui folhas simples, alternas, coriáceas, aromáticas, de 5 a 9 cm de comprimento (LORENZI; MATOS, 2008). Seu óleo essencial é biossintetizado e armazenado em tricomas glandulares globulares presentes nas folhas (VENTRELLA; MARINHO, 2008).

As flores são brancas, dispostas em espiga (Figura 2), com florescimento e frutificação irregulares dentro da mesma espiga. A floração ocorre durante os oito meses mais quentes do ano, com maior intensidade durante a primavera/verão e as flores são muito visitadas por abelhas europeias, himenópteras, moscas e borboletas (MONTANARI JÚNIOR, 2000).



**Figura 2.** Folhas e flores de *V. curassavica*. Foto: Cristiane Bolina. (Porto Seguro, Bahia, Brasil).

Os frutos são cariopses esféricas (LORENZI; MATOS, 2008), pequenos e avermelhados, comestíveis e muito procurados por pássaros de diversas espécies que involuntariamente fazem a dispersão das sementes (MONTANARI JÚNIOR, 2000). A propagação mais usual é através de sementes, embora possa ser propagada por estaquia caular (MONTANARI JÚNIOR, 2011) e por micropropagação (LAMEIRA; PINTO, 2006).

A planta é cultivada em todo o país para fins medicinais, mas eventualmente pode invadir terrenos baldios, pastagens e margens de estradas, tornando-se frequente e indesejável nas regiões litorâneas do Sudeste e Sul do Brasil, aonde chega a formar grandes invasões. É tolerante a terrenos arenosos e úmidos, florescendo nos meses de verão, além disso, tem preferência por áreas abertas e ensolaradas, mas é capaz de tolerar sombreamento (LORENZI, 2008).

A propriedade medicinal da espécie se deve à presença de  $\alpha$ -humuleno em seu óleo essencial, substância sesquiterpênica que apresenta ação anti-inflamatória (MONTANARI JÚNIOR, 2000). Popularmente, a planta é utilizada na forma de extratos alcoólicos, decocções e infusões devido as propriedades antiulceral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antirreumática, analgésica e tônica (AKISUE et al., 1983; VAZ et al., 2006; MEDEIROS et al., 2007; PASSOS et al., 2007).

### 5.1.1. Interesse comercial pela espécie

A produção agrícola de *V. curassavica* está concentrada em atender a demanda pelo óleo essencial destinado à fabricação do Acheflan<sup>®</sup>, medicamento produzido pela empresa brasileira Aché Laboratórios Farmacêuticos. No Brasil, o produto é líder de prescrição médica para tendinites crônicas e dores musculares, com mais de 25% de participação de mercado (ACHEFLAN, 2015).

Recentemente, o Aché Laboratórios fechou acordo com a farmacêutica mexicana Silanes, para lançar o Acheflan<sup>®</sup> no México. O fitomedicamento brasileiro entrará em um segmento de aproximadamente 6 milhões de unidades e US\$ 50 milhões, em que a expectativa de participação no mercado é de 1,9% em seu lançamento, chegando a 6,1% em cinco anos. Outro fator relevante para o aumento na demanda por óleo essencial de *V. curassavica*, é que o Aché tem contrato de venda do medicamento para outros quatro países: Peru, Chile, EUA e Japão (ACHEFLAN, 2015).

Além disso, encontra-se ainda no mercado o produto Cordia Extreme<sup>™</sup>, que apresenta as mesmas indicações do Acheflan<sup>®</sup> e é produzido pela empresa americana PhytoRich (EMERSON ECOLOGICS, 2015).

Com relação ao valor comercial do óleo essencial de *V. curassavica*, o litro do mesmo pode ser encontrado para compra por valores entre US\$ 4,500 a US\$ 7,000 (HERBORISTERIE BARDOU, 2015; OSHADHI, 2015).

Os fitomedicamentos são feitos a partir do extrato padronizado de plantas e seu mercado tem sido promissor, apresentando crescimento superior aos dos medicamentos sintéticos, com menor custo de pesquisa. O Brasil tem potencial para se destacar nessa área, principalmente por possuir a maior biodiversidade do planeta (BRANDÃO et al., 2006).

## 5.2. Óleos essenciais

Conforme a ISO 9235:2013, os óleos essenciais ou óleos voláteis são produtos obtidos de partes de plantas por meio da destilação por arraste a vapor, processos

mecânicos (frutos cítricos) ou destilação seca. Em geral, os constituintes dos óleos essenciais são fenilpropanoides, monoterpenos, sesquiterpenos e ocasionalmente, diterpenos (MARQUES et al., 2012).

Eles são armazenados em estruturas secretoras internas, como as células parenquimáticas diferenciadas e os canais oleíferos, e em estruturas secretoras externas, conhecidas como tricomas glandulares. As estruturas secretoras distribuem-se em diferentes órgãos das espécies aromáticas e, por isso, o óleo essencial pode ser obtido a partir de flores, frutos, sementes, folhas, caules, raízes e rizomas. Assim, o teor e composição química do óleo essencial podem variar de acordo com o órgão e estágio de desenvolvimento da planta (BIASE; DESCHAMPS, 2009), dentre outros fatores.

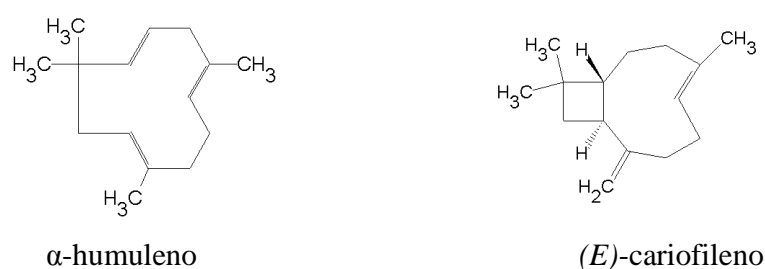
Os óleos essenciais desempenham papel importante na adaptação das plantas ao meio ambiente, atuando na reprodução das espécies vegetais por meio da atração de insetos polinizadores, em processos alelopáticos, e como repelentes contra insetos predadores. Sob o ponto de vista industrial, os óleos essenciais constituem importantes fontes de matérias-primas, em especial, para as indústrias de alimentos, produtos farmacêuticos, bebidas e perfumes, quer sob a forma bruta ou como substância isolada de fontes (por exemplo: citronelal, limoneno, carvona, citral, eugenol, mentol) de importância comercial (MARQUES et al., 2012).

Segundo dados disponíveis na Plataforma Aliceweb (2013), o mercado mundial de óleos essenciais movimenta anualmente cerca de 15 milhões de dólares e apresenta um crescimento de 11% ao ano. O Brasil é o terceiro produtor mundial óleos essenciais, com a participação concentrada basicamente sobre os óleos cítricos, que são subprodutos da produção de suco concentrado de laranja (MARQUES et al., 2013).

Bizzo et al. (2009) destacam que os principais problemas enfrentados pelo Brasil na produção mundial de óleos essenciais são a falta de manutenção e padrão de qualidade destes, a falta de representatividade nacional e os baixos investimentos governamentais, levando o Brasil a um quadro estacionário no setor.

A pesquisa aliada à grande biodiversidade, ainda pouco explorada em relação à composição química da sua flora, tendem a colocar o Brasil em uma situação promissora para aumentar a sua participação futura no mercado de óleos essenciais (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Aplicações do óleo essencial da espécie *V. curassavica* vêm sendo amplamente pesquisadas. Estudo realizado por Fernandes et al. (2007) sobre a atividade anti-inflamatória dos sesquiterpenos  $\alpha$ -humuleno e (*E*)-cariofileno (Figura 3) demonstrou que estas substâncias apresentam alta atividade em diversos modelos experimentais. Já Passos et al. (2007) verificaram que o óleo essencial da mesma espécie inibiu o efeito alérgico causado pelo veneno de abelhas em ratos sensibilizados e apresentou significativo efeito anti-inflamatório.



**Figura 3.** Estruturas químicas do  $\alpha$ -humuleno e (*E*)-cariofileno.

Além disso, o óleo essencial de *V. curassavica* apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (CARVALHO JÚNIOR et al., 2004) e atividade fungicida contra *Candida albicans* e *Candida krusei* (RODRIGUES et al., 2012).

Carvalho Júnior et al. (2004) verificaram rendimento de óleo essencial de 0,23% (v/p), extraído de folhas frescas de *V. curassavica*. Foram encontrados mono e sesquiterpenos, sendo os componentes majoritários  $\alpha$ -pineno (29,69%), (*E*)-cariofileno (25,27%), alo-aromadendreno (9,99%),  $\alpha$ -humuleno (4,64%) e  $\beta$ -gurjuneno (4,11%).

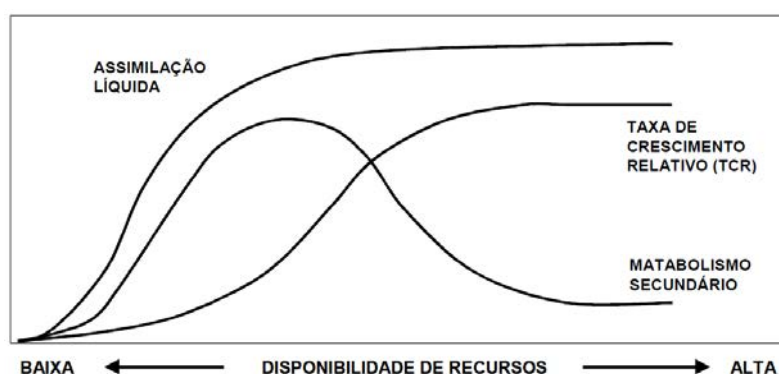
Visando o aumento da produção do princípio ativo, Montanari Jr. (2011) avaliou progênies de meios irmãos de plantas de *V. curassavica* e verificou que essas progênies apresentavam alta variabilidade genética e que esta variação poderia ser explorada para fins de melhoramento. Além disso, em estudo das correlações, ele observou que a produção de óleo essencial e de  $\alpha$ -humuleno está altamente correlacionada com a produção de biomassa, indicando que a prática da seleção indireta facilitaria o processo.

Contudo, além dos fatores genéticos, fatores externos como temperatura, chuva, vento, solo, latitude e altitude também exercem influência na biossíntese dos princípios ativos (CORRÊA JÚNIOR et al., 2006).

### 5.3. Deficiência hídrica e sua relação com o metabolismo especializado

Os fatores climáticos têm influência sobre o desenvolvimento das plantas medicinais, aromáticas e condimentares e sua produção de princípios ativos (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005; CORRÊA JÚNIOR et al., 2006). Sob condições de estresse, fotossíntese, crescimento e produção de metabólitos especializados não respondem igualmente a gradientes de água e nutrientes (MARCHESE, 1999). Sendo assim, o teor de princípios ativos pode aumentar ou diminuir, de acordo com a intensidade desse fator, cuja ação é simultânea e inter relacionada (CORRÊA JÚNIOR et al., 2006).

Marchese e Figueira (2005) esclarecem que quantidades limitadas de água têm efeito negativo sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas que sob deficiência hídrica moderada, algumas espécies medicinais, aromáticas e condimentares, podem apresentar acúmulo de substâncias bioativas, pois sob condições adversas, embora a planta continue a realizar fotossíntese, seu crescimento diminui e o excesso de fotoassimilados produzidos é redirecionado para o metabolismo especializado (Figura 4).



**Figura 4.** Taxa de assimilação líquida, taxa de crescimento relativo e metabolismo especializado, em resposta a mudanças na disponibilidade de recursos (Adaptado de Herms, Mattson, 1992). Fonte: Marchese, Figueira (2005).

Bettaieb et al. (2009) relataram aumento no rendimento de óleo essencial da parte aérea de *Salvia officinalis*, que apresentou rendimento de 0,39% no controle (100% da capacidade de campo), 1,77% sob deficiência hídrica moderada (50% da capacidade de campo) e 1,01% sob deficiência hídrica severa (25% da capacidade de campo). Com relação aos constituintes químicos do óleo essencial, os compostos majoritários foram os mesmos em comparação ao controle, entretanto, foram encontrados maiores teores destes nos tratamentos com deficiência hídrica.

Corroborando com estes resultados, Marchese et al. (2010) observaram que quando submetidas à deficiência hídrica moderada, 38 horas antes da colheita sem irrigação, plantas de *Artemisia annua* L. apresentaram aumento significativo de 29% no conteúdo de artemisinina, sem afetar o acúmulo de biomassa, sugerindo que a deficiência hídrica moderada antes da colheita pode não somente reduzir o tempo e os custos de secagem da cultura, mas também induzir ao acúmulo do princípio ativo, favorecendo o cultivo comercial da espécie.

Além disso, Nasrollahi et al. (2014) verificaram incremento no conteúdo de glicirrizina em estolões de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) submetido a deficiência hídrica severa (28 dias sem irrigação), indicando que a aplicação de seca controlada pode aumentar a produção de metabólitos especializados nesta espécie.

#### **5.4. Ecofisiologia vegetal**

A Ecofisiologia vegetal surgiu da necessidade de se compreender as respostas das plantas em relação ao ambiente. Lambers et al. (1998) definem ecofisiologia como o estudo das interações entre o ambiente físico e a fisiologia dos organismos. Esta área de pesquisa tem-se desenvolvido rapidamente como uma interface entre Ecologia e Fisiologia, onde a primeira faz os questionamentos e a segunda fornece as ferramentas para determinar mecanismos de resposta (LAMBERS et al., 1998).

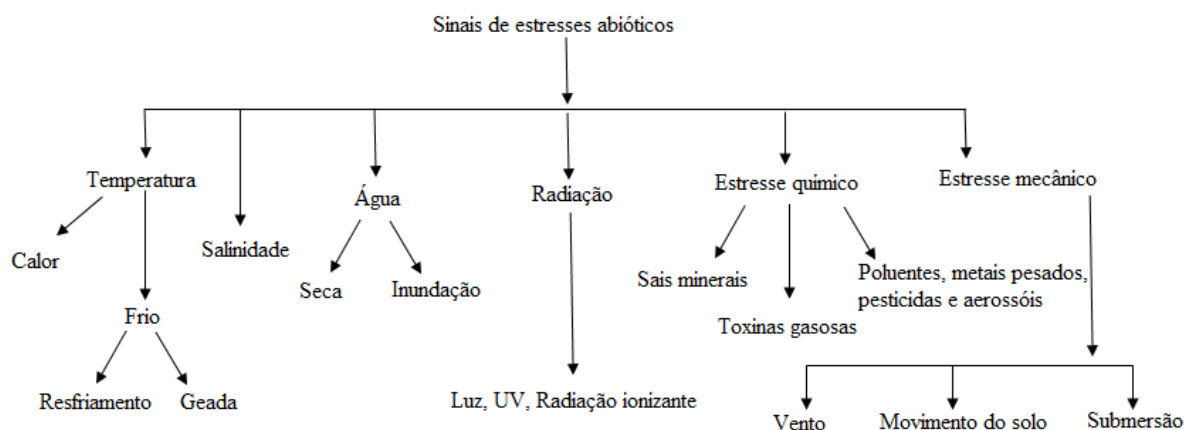
Com o crescente aumento da população mundial e as atuais perdas agrícolas decorrentes das mudanças climáticas, a ecofisiologia de plantas tem trazido várias contribuições à agricultura, pois de maneira geral, um dos principais objetivos da pesquisa



agrícola é desenvolver genótipos menos sensíveis aos estresses ambientais, para que possam ser cultivados e produzirem em áreas com limitações de espaço ou de recursos naturais (LAMBERS et al., 1998; MAHAJAN; TUTEJA, 2005; FRAIRE-VELÁZQUEZ; BALDERAS-HERNÁNDEZ, 2013).

O estresse em plantas pode ser definido como fatores bióticos ou abióticos que reduzem os processos fisiológicos normais, alteram a homeostase do metabolismo e exigem o ajuste das vias metabólicas (SHULAEV et al., 2008; CIARMIELLO et al., 2011).

Atualmente, as perdas de safras têm sido provocadas, principalmente, por estresses abióticos (Figura 5), que reduzem o rendimento médio das principais culturas em mais de 50% (CIARMIELLO et al., 2011). Entre as causas de estresse, a frequência e a intensidade da deficiência hídrica constituem os fatores mais limitantes a produção agrícola mundial (JONES, 1992; SANTOS; CARLESSO, 1998).



**Figura 5.** Fatores abióticos causadores de estresse em plantas (Adaptado de Ramakrishna; Ravishankar, 2011).

O estresse hídrico pode surgir como resultado do excesso ou falta de água. A inundação é um exemplo de excesso de água que resulta, principalmente, na redução da oferta de oxigênio para as raízes, limitando a absorção de nutrientes e a respiração. Contudo, o estresse hídrico provocado pela escassez de água é o mais comum e assim como o estresse salino, causam desidratação das células e desequilíbrio osmótico (MAHAJAN; TUTEJA, 2005).



A exigência hídrica de uma cultura é atendida por meio de interações que se estabelecem ao longo do sistema solo-planta-atmosfera, sendo a combinação destes três seguimentos imprescindível para definir o estado hídrico da planta, pois à medida que o solo seca, torna-se mais difícil para as plantas absorverem água, porque aumenta a força de retenção e diminui a água disponível. Assim, a necessidade de fluxo de água neste sistema será maior quando à demanda evaporativa da atmosfera estiver mais elevada (SANTOS; CARLESSO, 1998).

O estado da água no solo, planta e atmosfera é descrito como potencial hídrico ( $\Psi_w$ ), isto é, o potencial químico da água em específica parte do sistema, como por exemplo, na folha, comparada com o potencial químico da água pura. O  $\Psi_w$  é medido em unidades de pressão denominadas Megapascal (MPa) e o potencial da água pura, ou seja, a água livre na pressão atmosférica e na temperatura de 298K (25 °C), é definido como 0 MPa. Em um sistema isotermal de dois compartimentos, nos quais as duas partes são separadas por uma membrana semipermeável, a água moverá do alto para o baixo potencial hídrico (LAMBERS et al., 1998).

As características físicas do solo definem o movimento da água deste para a atmosfera através da planta, ou seja, em solos arenosos, onde a área superficial é menor, a capacidade de retenção de água é menor, enquanto em solos argilosos, que possuem alto teor de matéria orgânica, a retenção de água é maior (TAIZ; ZEIGER, 1991; SANTOS; CARLESSO, 1998).

#### **5.4.1. Mecanismos de resposta à deficiência hídrica**

A deficiência hídrica provoca uma série de respostas da planta, começando pela percepção do estresse, que inicia a via de transdução do sinal e se manifesta em mudanças a nível celular, fisiológico e no desenvolvimento (BRAY, 1993). Os efeitos prejudiciais do estresse são compensados pelas plantas por meio de diversos mecanismos que operam em diferentes escalas de tempo, dependendo da natureza do estresse e dos processos fisiológicos que são afetados (LAMBERS et al., 1998).

Frequentemente, o crescimento e a reprodução das plantas são os mais significativamente afetados pelo estresse hídrico. Esta redução no desenvolvimento se deve ao

fato de que 40% da massa seca das plantas consiste de carbono fixado na fotossíntese, assim, a redução da fotossíntese provoca decréscimo na assimilação de carbono (LAMBERS et al., 1998).

Outra resposta à deficiência hídrica é o aumento na senescência foliar, pois o solo seco não é capaz de fornecer nitrogênio suficiente para suprir as necessidades de crescimento da cultura e o nitrogênio do interior da planta é retranslocado das folhas mais velhas para os pontos de crescimento. Assim, a intensidade da senescência vai depender da quantidade de nitrogênio no solo, das reservas de nitrogênio na planta e da demanda de nitrogênio dos pontos de crescimento (WOLFE et al., 1988; SANTOS; CARLESSO, 1998).

A ciclagem de carbono (C) e de nitrogênio (N) é um processo ecológico fundamental e tem ganhado importância devido ao interesse na dinâmica dos estoques desses elementos, seus impactos nos ecossistemas e a contribuição dos fluxos de gases, como CO, CO<sub>2</sub>, NO e N<sub>2</sub>O para o aquecimento global. Os ciclos de C e N têm sido estudados, nas últimas décadas, utilizando técnicas de espectrometria de massas, pela medida da abundância natural ( $\delta$ ) dos isótopos estáveis raros <sup>13</sup>C e <sup>15</sup>N em relação ao isótopo mais abundante <sup>12</sup>C e <sup>14</sup>N (PARRON et al., 2004).

Os isótopos <sup>13</sup>C e <sup>15</sup>N têm tido ampla aplicação na pesquisa científica, não somente por serem estáveis, mas porque são isótopos de dois elementos de grande importância para o crescimento vegetal e que possuem os ciclos mais complexos nos sistemas agrícolas (YAKIR; STERNBERG, 2000; ALVES et al., 2006).

Sternberg et al. (1986) esclarecem que a análise de isótopos de matéria vegetal é um método eficiente para descobrir o mecanismo fotossintético das plantas, identificando-as como C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> ou CAM, com base nas proporções de isótopos estáveis de carbono. Assim como Sternberg et al. (1986), Silva et al. (2010) destacaram a confiabilidade da caracterização fotossintética de plantas por meio de isótopos estáveis de carbono (<sup>12</sup>C e <sup>13</sup>C), acrescentando que eles podem auxiliar diretamente em estudos fotossintéticos, na translocação e alocação de carbono e em avaliações de estresse hídrico.

Independentemente do tipo de metabolismo, a falta de água leva à redução na atividade fotossintética e aumento na respiração das plantas que, por sua vez, leva à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são formas reduzidas de oxigênio atmosférico (O<sub>2</sub>), e normalmente, resultam da excitação de O<sub>2</sub> para formar

oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) ou a partir da transferência elétrons para  $\text{O}_2$  para formar o íon radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) ou o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (MITTLER, 2002). Em comum, os diferentes tipos de EROs possuem a capacidade de causar danos às proteínas, ao DNA e aos lipídeos, podendo levar a morte celular (CAVERZAN, 2008).

As plantas desenvolveram mecanismos de proteção não enzimática e enzimática para minimizar os efeitos nocivos das EROs (MARCHESE et al., 2008). De acordo com Scandalios (2005), na defesa não enzimática, incluem compostos de propriedade antioxidante intrínseca, como as vitaminas C e E, a glutathione e o  $\beta$ -caroteno. Já na defesa enzimática atuam a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (POX), convertendo o radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em espécies menos reativas. O SOD cataliza a dismutação do  $\text{O}_2^-$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , enquanto a CAT e as POX reduzem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  disponível formando  $\text{H}_2\text{O}$ . Assim, o SOD, a CAT e as POX funcionam em conjunto, como linha de frente para defesas antioxidantes.

Além do aumento da atividade enzimática, quando expostas ao estresse hídrico, as plantas podem apresentar acúmulo de prolina sendo este acúmulo associado à tolerância das plantas a essa condição desfavorável, podendo representar um mecanismo regulador da perda de água, mediante aumento da osmolaridade celular. Além disso, sob a influência do estresse, a síntese de proteínas é inibida e a degradação destas é acelerada, o que leva ao acúmulo de aminoácidos e aminas livres (FUMIS; PEDRAS, 2002).

De modo geral, quando o estresse oxidativo ocorre, a célula age contra o efeito oxidante para restaurar o balanço redox. Desta maneira a atividade celular conduz à ativação ou ao silenciamento de genes que codificam enzimas de defesa, fatores de transcrição e proteínas estruturais. As ferramentas da genômica estão expandido a compreensão ao estresse oxidativo e acelerando a descoberta de genes de resposta as EROs (SCANDALIOS, 2005).

Sabe-se que a adaptação à seca é função multigênica e depende de várias características fisiológicas e morfológicas, ou por meios bioquímicos e ajustes moleculares em toda planta, sendo que, a adaptação bioquímica pode envolver tanto o metabolismo primário quanto o especializado (BRAY, 1993; KANNAN; KULANDAIVELU; 2011). Contudo, o conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas

das plantas aos estresses ambientais ainda é bastante limitada, mas um número cada vez maior de genes têm sido identificados nos últimos anos (CIARMIELLO et al., 2011).

Ciarmiello et al. (2011) esclarecem que as respostas ao estresse hídrico requerem a produção de proteínas metabólicas importantes, como as envolvidas na síntese de osmoprotetores e de proteínas reguladoras que operam nas vias de transdução de sinal, tais como cinases ou fatores de transcrição (TFs).

Alguns genes envolvidos na indução de resposta ao estresse foram identificados por análises de microarrays (chips de DNA) em várias espécies de plantas, tais como *Arabidopsis* e arroz. A análise das funções destes genes é fundamental para promover nossa compreensão dos mecanismos moleculares que regulam essas respostas, levando a aumentar a tolerância das espécies através da manipulação genética (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Nasrollahi et al. (2014) estudaram os genes envolvidos na biossíntese de saponinas triterpênicas em alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) e verificaram que o estresse hídrico aumentou os níveis de expressão dos genes esqualeno-síntase (SQS) e  $\beta$ -amirina-síntase (bAS) em estágio de plântula adulta. Além disso, evidenciaram incremento no conteúdo de glicirrizina sob estresse severo, indicando que a expressão destes genes pode estar envolvida na síntese de metabólitos especializados em plantas de alcaçuz.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação de maio a outubro de 2013, no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico (IAC), localizado no município de Campinas, SP (22°52' de latitude sul, 47°04' de longitude oeste e 677,0 metros de altitude). O clima regional é classificado como Cwa - clima subtropical com verões quentes e invernos secos (KÖPPEN, 1948).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos, utilizando-se três repetições (análises químicas e conteúdo relativo de água) ou seis repetições (análises biométricas, fisiológicas, isotópicas e bioquímicas). Os tratamentos foram representados por quatro potenciais de água no xilema da folha ( $\Psi_w$ ), definidos a partir de pré-testes: T1:  $\Psi_w \sim -0,3$  MPa (controle - sempre irrigado); T2:  $\Psi_w \sim -1,0$  MPa; T3:  $\Psi_w \sim -1,7$  MPa e T4:  $\Psi_w \sim -2,5$  MPa. O experimento foi composto por 288 plantas.

Foram utilizadas mudas micropropagadas de *Varronia curassavica* obtidas a partir de uma única planta matriz, produzidas pela empresa Clonagri, em Arthur Nogueira-SP. Uma exsicata da planta clone foi depositada no Herbário do Instituto Agronômico (IAC) sob o número IAC-55230.

As mudas, com aproximadamente 15 cm de altura, foram mantidas sob telado com irrigação três vezes ao dia, de maio a julho de 2013, para aclimatização e desenvolvimento. Após este período foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade para sete litros (Nutriplan, 32x11x15cm).

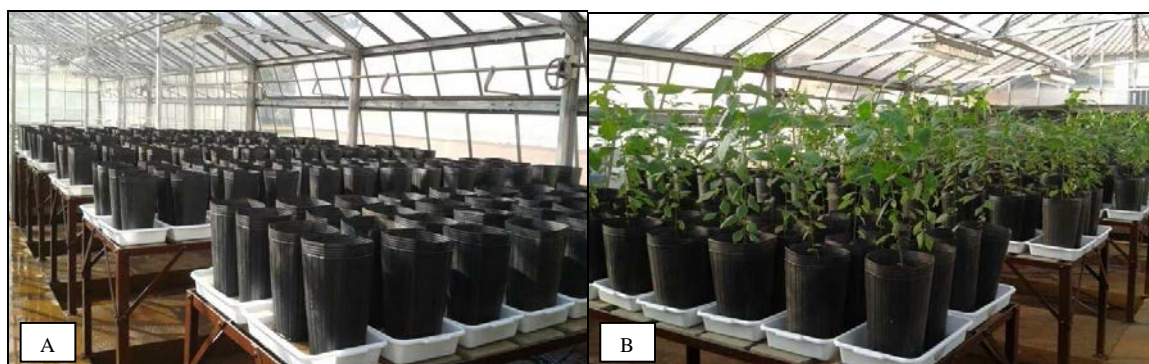
O substrato utilizado nos vasos era composto por 60% de areia branca grossa e 40% de solo, peneirados para homogeneizar sua textura. O solo empregado foi coletado na área da Fazenda Santa Elisa, pertencente ao Instituto Agrônômico (IAC), onde o mesmo é incorporado a cascas de algodão e sementes de mamona para utilização em experimentos. Não foi necessária a realização de calagem e adubação, devido às boas características químicas deste solo (Tabela 1). Todos os vasos receberam sete quilogramas de substrato, aferida por pesagem.

**Tabela 1.** Características químicas do solo utilizado nos vasos com *Varronia curassavica* Campinas, São Paulo, 2014.

Ítem	pH (H <sub>2</sub> O)	P	K	Ca	Mg	Al	H+	SB	CTC	V	M.O	B	Cu	Fe	Mn	Zn
		mg/dm <sup>3</sup>			cmol/dm <sup>3</sup>				(%)							
SOLO	5,3	96	4,1	35	14	0,0	20	53,1	73,1	73	23	0,28	6,2	34	12,7	12,7

**P**-Fósforo; **K**-Potássio; **Ca**-Cálcio; **Mg**-Magnésio; **Al**-Alumínio; **H+Al**-Acidez Potencial; **SB**-Soma de Bases; **CTC**-Capacidade de Troca de Cátions (CTC total); **V**-Saturação em Bases; **M.O**-Matéria Orgânica; **B**- Boro; **Cu**- Cobre; **Fe**- Ferro; **Mn**- Manganês; **Zn**-Zinco.

Os vasos foram colocados sobre bandejas plásticas (Rainha, 6,5 L, 36 cm), onde se manteve lâmina de água com aproximadamente 2 cm, considerando-se que a água ascendeu por capilaridade em sistema de subirrigação, durante todo o período que antecedeu a aplicação dos tratamentos (Figura 6A). Este sistema foi adotado por permitir o uso racional da água de irrigação, evitar a lixiviação do solo (GENEVE et al., 2004) e manter a capacidade de campo.



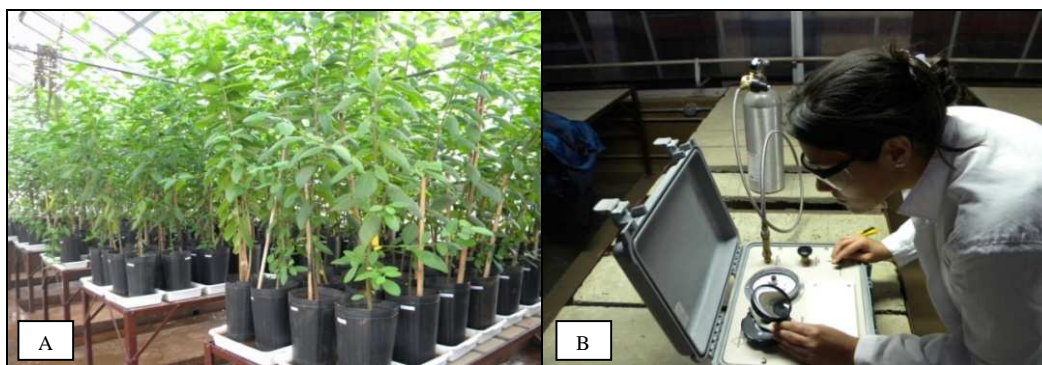
**Figura 6.** A- Instalação do experimento: vasos colocados sobre bandejas em casa de vegetação. B- Transplante das mudas para os vasos plásticos.

Em 11 de julho de 2013, as plantas foram transferidas para casa de vegetação e transplantadas para os vasos plásticos (Figura 6B).

A ventilação da casa de vegetação foi acionada automaticamente nos períodos mais quentes do dia (10h, 12h, 14h e 16h) para amenizar a temperatura ambiente e evitar estresse por temperatura. A média da temperatura máxima dentro da casa de vegetação durante todo o período do experimento foi de 31°C e a umidade relativa média foi de 43%.

A supressão da irrigação foi feita em 02 de outubro de 2013, quando 50% das plantas iniciaram a emissão de botão floral, pela retirada das bandejas com água, exceto das plantas destinadas ao tratamento controle (Figura 7A). No dia seguinte à supressão iniciaram-se as mensurações do potencial de água no xilema das folhas ( $\Psi_w$ ) para verificar o momento exato em que as plantas atingiriam os potenciais determinados.

Esta avaliação foi realizada diariamente antes do amanhecer, por volta das 04h30min da manhã, em folhas da parte mediana, utilizando-se câmara de pressão (Soilmoisture Equipment Corporation, Sta. Barbara, CA, USA) conforme método descrito por Boyer (1995) (Figura 7B).



**Figura 7.** A- Plantas no momento da supressão da irrigação. B- Avaliação do  $\Psi_w$  utilizando câmara de pressão.

No dia 08 de outubro, seis dias após a supressão da irrigação, 50% das plantas avaliadas apresentaram potencial de água no xilema das folhas de  $\sim -1,0$  MPa. Neste momento foram realizadas as avaliações de conteúdo relativo de água, teor relativo de clorofila, trocas gasosas, análises de características biométricas e de análises de crescimento. Além disso, coletou-se material foliar para as análises de óleos essenciais, bioquímicas e

composição isotópica, em plantas do tratamento controle ( $\sim -0,3$  MPa) e plantas com potencial hídrico de  $\sim -1,0$  MPa.

O mesmo procedimento foi realizado nos dias 09 (sete dias após a supressão da irrigação) e 10 de outubro (oito dias após a supressão da irrigação), quando as plantas apresentaram potenciais hídricos no xilema das folhas de  $\sim -1,7$  MPa e  $\sim -2,5$  MPa, respectivamente. As metodologias utilizadas nas avaliações estão descritas a seguir.

### 6.1. Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água na folha (CRA) foi analisado em três repetições por tratamento, conforme Barrs e Weatherley (1962), pela expressão matemática:

$$\text{CRA (\%)} = [(MF-MS) / (MT-MS)] * 100$$

As folhas foram retiradas das plantas às 7h da manhã e levadas imediatamente ao laboratório, onde foram cortados 10 discos foliares ( $\cong 1,2$  mm) entre a bordadura e a nervura central da folha, de cada planta (Figura 8). Os discos foliares foram pesados para obtenção da massa fresca (MF). A massa do tecido túrgido (MT) foi obtida após a reidratação dos discos, colocados em placa de Petri com água destilada por 24 horas, retirada do excesso de água dos discos com lenço de papel e pesagem dos mesmos. Já a massa seca (MS) obteve-se após pesagem dos discos, secos em estufa a  $40$  °C por 24 horas.



**Figura 8.** Corte dos discos foliares para avaliação do conteúdo relativo de água (CRA).



## 6.2. Teor relativo de clorofila

O teor relativo de clorofila foi estimado às 9h da manhã, em três plantas de cada tratamento, realizando-se cinco leituras por planta com o auxílio de clorofilômetro (SPAD 502 Plus, Konica Minolta, NJ, EUA) (Figura 9).



**Figura 9.** Avaliação do teor relativo de clorofila com o auxílio de clorofilômetro.

## 6.3. Trocas gasosas

As análises de trocas gasosas foram realizadas às 10h da manhã em seis plantas de cada tratamento, com o uso de analisador de gases portátil por infravermelho LI-6400XT (LI-COR, LINCOLN, NEBRASKA - USA) (Figura 10), analisando-se a taxa assimilatória líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intracelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) e taxa de transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). De posse destes dados, foram quantificadas a eficiência no uso de água (EUA,  $\text{mmol mol}^{-1}$ ), calculada pela razão  $A/E$ , e a eficiência instantânea da carboxilação (EiC,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), calculada pela razão  $A/C_i$  (ZHANG et al., 2001).



**Figura 10.** Análise das trocas gasosas com o uso de analisador de gases portátil.

As condições microclimáticas na câmara de análise foram mantidas constantes durante as leituras, estando a PAR (Photosynthetic Active Radiation) em torno de  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e a concentração de  $\text{CO}_2$  ambiente de  $300 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ .

#### **6.4. Análises de Características Biométricas**

Após estas avaliações e por volta de 11h, seis plantas de cada tratamento foram colhidas e submetidas às análises de altura da planta (AL, m), diâmetro de caule (DC, cm), número de folhas (NF, un), massa foliar fresca (MFF, g), massa de caule fresco (MCF, g), massa de raiz fresca (MRF, g), massa total fresca (MTF, g) e volume de raiz (VR,  $\text{cm}^3$ ), determinado colocando-se as raízes em proveta graduada, contendo 70 mL de água, e obtendo-se o volume de raiz pela diferença entre os volumes:  $1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3$ . A área foliar total (AF,  $\text{cm}^2$ ) foi determinada com o auxílio de medidor de área foliar (LI-COR Model 3100 Area Meter).

As partes frescas foram mantidas em estufa com circulação de ar a  $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5$ , até peso constante, para determinação da massa foliar seca (MFS, g), massa de caule seco (MCS, g), massa de raiz seca (MRS, g) e massa total seca (MTS, g).

##### **6.4.1. Análises de crescimento**

Os dados de massa seca e área foliar foram utilizados para compor as seguintes análises de crescimento: RMF (razão de massa foliar) e RAF (razão da área foliar), conforme Benincasa (2003), utilizando-se seis repetições por tratamento.

✓ RMF - Relata a fração de biomassa total investida nas folhas:

$RMF = MFS / MTS$  (Massa de folhas secas/Massa total seca), em  $g\ cm^{-2}$

✓ RAF - Reflete o tamanho da área fotossintética em relação à massa respiratória:

$RAF = AF / MTS$  (área foliar total/Massa total seca), em  $cm^2\ g^{-1}$

### 6.5. Análises do óleo essencial

As extrações e análises para identificação e quantificação das substâncias presentes no óleo essencial de *V. curassavica* foram conduzidas na Unidade de Fitoquímica do Centro de P&D de Recursos Genéticos do Instituto Agrônomo (IAC).

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas com três repetições, sendo cada repetição composta por seis plantas, devido à baixa quantidade de massa foliar seca (MFS) por planta. Após pesagem da MFS obtida em cada tratamento, aproximadamente 80 g, o óleo essencial foi hidrodestilado em aparato tipo *Clevenger* por 02h30min. Os óleos tiveram seu peso medido em balança analítica para obtenção da massa de óleo extraído (MOE) e em seguida determinou-se o rendimento (%) de óleo essencial pela expressão:

$$R (\%) = (MOE / MFS) * 100$$

Posteriormente, os óleos essenciais foram armazenados em frascos de vidro e conservados sob refrigeração a 4 °C.

A separação e quantificação (método de normalização de área) das substâncias presentes no óleo essencial foram realizadas com três repetições e em triplicata, com o auxílio de cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010). Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano - J&W Scientific; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; gás de arraste hélio; 1 mL

min<sup>-1</sup>), injetor a 230 °C, detector a 240 °C, modo de injeção split (1/20); injeção de 1 µL de solução de óleo essencial (1 µL do óleo essencial em 1 mL de acetato de etila - grau Cromatográfico) no seguinte programa de temperatura: 60 °C - 240 °C, 3 °C/min.

A identificação das substâncias foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por ionização eletrônica (70 eV); dotado de coluna capilar de sílica fundida OV-5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano - Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), empregando-se as mesmas condições operacionais do CG-DIC. Os espectros de massas das substâncias foram comparados com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib., Wiley 139 lib.) e os índices de retenção (IR) com os dados da literatura (Adams, 2007). Os IR das substâncias foram obtidos por meio da injeção de uma série homóloga de n-alcenos (C<sub>9</sub>-C<sub>24</sub> - Sigma Aldrich) nas mesmas condições cromatográficas anteriormente descritas, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963).

## 6.6. Análise de isótopos estáveis

As análises de isótopos estáveis foram conduzidas no Laboratory of Stable Isotope Ecology in Tropical Ecosystems da University of Miami, Florida, EUA.

Folhas de *V. curassavica* foram secas em estufa a ± 50 °C por 24 horas, cortadas em seções de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> e armazenadas em microtubos. Foram realizadas seis repetições.

As amostras foliares foram pulverizadas em máquina de pulverização Retsch MM200, por 3 min., frequência 25 s<sup>-1</sup>, para obtenção de um pó fino. Alíquotas de cerca de 5 mg de cada amostra foram pesadas em copos de estanho e queimadas em Eurovector Elemental Analyzer (Milan, Italy) a 1050 °C. Os gases resultantes foram separados e analisados em espectrômetro de massas de razão isotópica (Isoprime, GV, Manchester, Inglaterra) para obtenção das razões de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio.

O espectrômetro de massas de razão isotópica de fluxo contínuo (CFIRMS) realiza a medição sequencial automatizada das amostras junto com o material de referência. Para cada 10 amostras em sequência utilizou-se um padrão laboratorial interno (ground soybeans). As razões de isótopos estáveis são expressas em “δ” (delta) como partes

por mil (‰) em relação ao padrão internacional *Pee Dee Belemnite* (PDB) para carbono e nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) para nitrogênio, conforme as seguintes equações:

$$\delta^{13}C = \left[ \frac{R_{sample}}{R_{standard}} - 1 \right] \cdot 1000 \quad \delta^{15}N = \left[ \frac{R_{sample}}{R_{standard}} - 1 \right] \cdot 1000$$

Em que R representa o razão entre isótopos pesados e leves de carbono ou nitrogênio para a amostra e o padrão, respectivamente.

## 6.7. Análises bioquímicas

### 6.7.1. Coleta e armazenamento do material vegetal

Para a realização das análises bioquímicas foram coletadas seis folhas expandidas da região mediana das plantas, em seis plantas por tratamento, totalizando-se 24 amostras foliares. As coletas foram realizadas por volta das 09h30min, sendo as folhas acondicionadas em envelopes de alumínio e imediatamente imersas em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram mantidas sob refrigeração em freezer a – 80 °C.

Posteriormente, este material vegetal foi transportado em nitrogênio líquido para o Laboratório de Bioquímica, Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, onde foram realizadas as análises.

No processamento do material, as folhas foram moídas em almofariz, na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Após pesagem, as amostras foram transferidas para microtubos e armazenadas em freezer a – 20 °C.

### 6.7.2. Procedimentos para obtenção do extrato bruto

As amostras armazenadas foram processadas para a obtenção de três diferentes extratos brutos. Os extratos para quantificação de teor de açúcares totais, proteínas solúveis totais e atividades enzimáticas (SOD e POX) foram obtidos pela ressuspensão de 500

mg do material vegetal moído em 4 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, acrescido de 200 mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona) e 200 mg de areia lavada. Após centrifugação por 15 min a 6.500  $\times$  g a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e armazenado em *freezer* a – 20 °C.

O segundo extrato foi obtido para a análise do teor de L-prolina. Primeiramente, amostras de 500 mg de tecido foliar moído foram ressuspensas em 10 mL de uma solução de ácido sulfosalicílico (3% em água destilada). Após centrifugação por 10 min a 6.500  $\times$  g a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado a – 20 °C.

O extrato bruto para a análise de peroxidação de lipídeos foi obtido pela homogeneização de 200 mg de tecido foliar moído em 4 mL de tampão TCA (ácido tricloroacético, 1% p/v).

As análises descritas a seguir foram realizadas com seis repetições por tratamento, variando-se apenas as replicatas (duplicata ou triplicata).

#### **6.7.2.1. Determinação do teor de açúcares totais**

A quantificação de açúcares totais foi determinada em duplicata pelo método de Dubois et al. (1956). Para as análises, 20  $\mu$ L de extrato bruto foram adicionados a 980  $\mu$ L de água destilada, 500  $\mu$ L de fenol 5% (Folin Ciocauteau, Dinâmica Ltda.) e 2,5 mL de ácido sulfúrico (Anidrol, 95 a 98% de pureza) em tubos de ensaio. Após 20 min de incubação, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, UVmini-1240) a 490 nm com o auxílio de cubetas de vidro (4 mL e 10 mm de caminho óptico), e comparadas com a curva padrão de glicose (concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>).

#### **6.7.2.2. Determinação do teor de proteínas solúveis totais**

A concentração de proteína solúvel presente nos extratos foi determinada em triplicata utilizando-se o método descrito por Bradford (1976) com albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich, 98% de pureza) como proteína padrão. Em tubos de ensaio foram pipetas alíquotas de 100  $\mu$ L de extrato acrescidas de 5 mL de reativo de Bradford (Figura 11). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, UVmini-1240) a

595 nm com o auxílio de cubetas de poliestireno (4 mL e 10 mm de caminho óptico), após 15 min de incubação e comparadas com o padrão (BSA), pela equação da reta.



**Figura 11.** Análise da concentração de proteínas solúveis totais presentes nos extratos.

### **6.7.2.3. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)**

A determinação da atividade da SOD considera a capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT). Primeiramente, preparou-se uma solução contendo 13 mM de metionina (L-metionina, Sigma-Aldrich, 98,5% de pureza), 75  $\mu$ M de NBT (Sigma-Aldrich, 98% de pureza), 100 nM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, BioAgency, 99% de pureza) e 2  $\mu$ M de riboflavina (Vitamina B<sub>2</sub>, Vetec, 96% de pureza) em 2,9 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, método adaptado de Del Longo et al. (1993).

As análises foram realizadas em triplicata, pipetando-se 2,9 mL da solução acrescida de 100  $\mu$ L de extrato bruto, em placas de Elisa (Biofil, 24 células). A reação foi iniciada pela iluminação das placas com solução reagente, em câmara composta por tubos fluorescentes (15 W), a 25° C, durante 5 min. O final da catálise foi estabelecido pela interrupção da luz (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

O composto azul formado (formazana) pela fotoredução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro (Shimadzu, UVmini-1240) a 560 nm com o

auxílio de cubetas de poliestireno (4 mL e 10 mm de caminho óptico). Uma unidade de SOD foi definida como a atividade da enzima necessária para a inibição de 50% da fotorredução do NBT. Para o cálculo da atividade específica da enzima, considerou-se a porcentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ).

#### **6.7.2.4. Atividade da enzima Peroxidase (POX; EC 1.11.1.7)**

A atividade da enzima peroxidase foi determinada em triplicata, pela diluição (1:25) de 100  $\mu\text{L}$  de extrato bruto adicionados a 4,9 mL de solução tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 contendo 20 mM de Pirogalol (Merck, 99,5% de pureza) e 20 mM peróxido de hidrogênio (Impex, 35% de pureza mínima). Após incubação por 1 min, a reação foi paralisada adicionando 0,5 mL de ácido sulfúrico (Anidrol, 95 a 98% de pureza) e as leituras realizadas em triplicata utilizando-se espectrofotômetro (Shimadzu, UVmini-1240) com comprimento de onda de 420 nm e cubetas de poliestireno (4 mL e 10 mm de caminho óptico) (KAR; MISHRA, 1976). A atividade específica ( $\mu\text{Kat } \mu\text{g } \text{Prot}^{-1}$ ) da enzima foi determinada com base na formação de purpurogalina, produto resultante da reação da pirogalol oxidase na eliminação das espécies reativas de oxigênio, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (PEIXOTO et al., 1999; DOMINGOS et al., 2005).

#### **6.7.2.5. Determinação do teor de L-prolina**

O teor de L-prolina foi determinado utilizando-se o método de Bates et al. (1973), em duplicata. Para a realização do teste colorimétrico, foram pipetadas em tubos de ensaio alíquotas de 2 mL do extrato bruto, 2 mL de ninhidrina ácida (Vetec, 99% de pureza) e 2 mL de ácido acético glacial (Anidrol, 99,7% de pureza). Após aquecimento em banho-maria à aproximadamente 100 °C por 60 min, a reação foi finalizada em banho de gelo. Em seguida, procedeu-se a extração acrescentando-se 4 mL de tolueno (Synth, 98,8% de pureza) aos tubos e agitando-os em vortex por 30 s, obtendo-se a separação da fase orgânica contendo o cromóforo (Figura 12).





**Figura 12.** Análise do teor de L-prolina.

As absorvâncias desta fase foram determinadas em espectrofotômetro (Shimadzu, UVmini-1240) a 520 nm, utilizando-se cubetas de vidro (4 mL e 10 mm de caminho óptico). A quantificação do teor de prolina foi possível pela comparação das leituras das absorvâncias com uma curva padrão (ninhidrina ácida + ácido acético glacial + ácido fosfórico) com concentrações de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 mg de L-prolina p.a.

#### **6.7.2.6. Determinação da peroxidação de lipídeos**

O homogenato obtido no item 4.7.2 foi filtrado em lã de vidro e centrifugado por 15 min a  $6.500 \times g$ . Após centrifugação, pipetou-se 1 mL do sobrenadante em 3 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% p/v (Merck, 99% de pureza) acrescido de ácido tricloroacético (TCA) 20% p/v (Vetec, 99% de pureza) em tubos de ensaio, em duplicata. Os tubos foram colocados em banho-maria *dubnoff* a  $95^{\circ} C$  por 60 min e após incubação, transferidos para banho de gelo. Em seguida, a solução foi novamente centrifugada a  $6.500 \times g$  por 10 min.

As leituras das absorvâncias do sobrenadante foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, UVmini-1240) a 532 nm e 660 nm (para subtrair, isolando-se interferentes) utilizando-se cubetas de poliestireno (4 mL e 10 mm de caminho óptico) e a concentração foi calculada utilizando-se coeficiente de extinção molar do aldeído malônico

(MDA, resultante da decomposição de ácidos graxos das biomembranas) que é  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **6.8. Métodos de análise dos resultados**

Os resultados de todas as avaliações foram submetidos à análise de variância e de regressão utilizando-se o programa computacional ASSISTAT 7.7 *beta*. Na análise de regressão, as equações que melhor se ajustaram aos dados foram escolhidas com base na significância dos coeficientes de regressão ao nível de significância de 1% (\*\*) e 5% (\*) pelo Teste F, e no maior coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>).

Nos resultados da composição química dos óleos essenciais foi aplicada análise multivariada, utilizando-se a Análise de Componentes Principais (ACP), além disso, realizou-se análise de agrupamento, agrupando-se os tratamentos de acordo com a sua composição química, considerando as sete substâncias com maiores proporções relativas no óleo essencial de *V. curassavica*, pela análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica (CAH), empregando-se o programa XLSTAT (2012).

## 7. RESULTADOS OBTIDOS

### 7.1. Análises de características biométricas

Por intermédio da análise de variância da regressão pode-se verificar diferenças significativas para o efeito dos diferentes potenciais hídricos no xilema da folha ( $\Psi_w$ ) em relação às variáveis biométricas, conforme apresentado nas Tabelas 2 e 3.

Na Tabela 2 observa-se diferença significativa pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade para as variáveis altura de planta (AL) e área foliar (AF). O modelo matemático que melhor se ajustou ao conjunto de dados destas variáveis foi o linear, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de 0,92 para AL e 0,98 para AF (Figura 13).

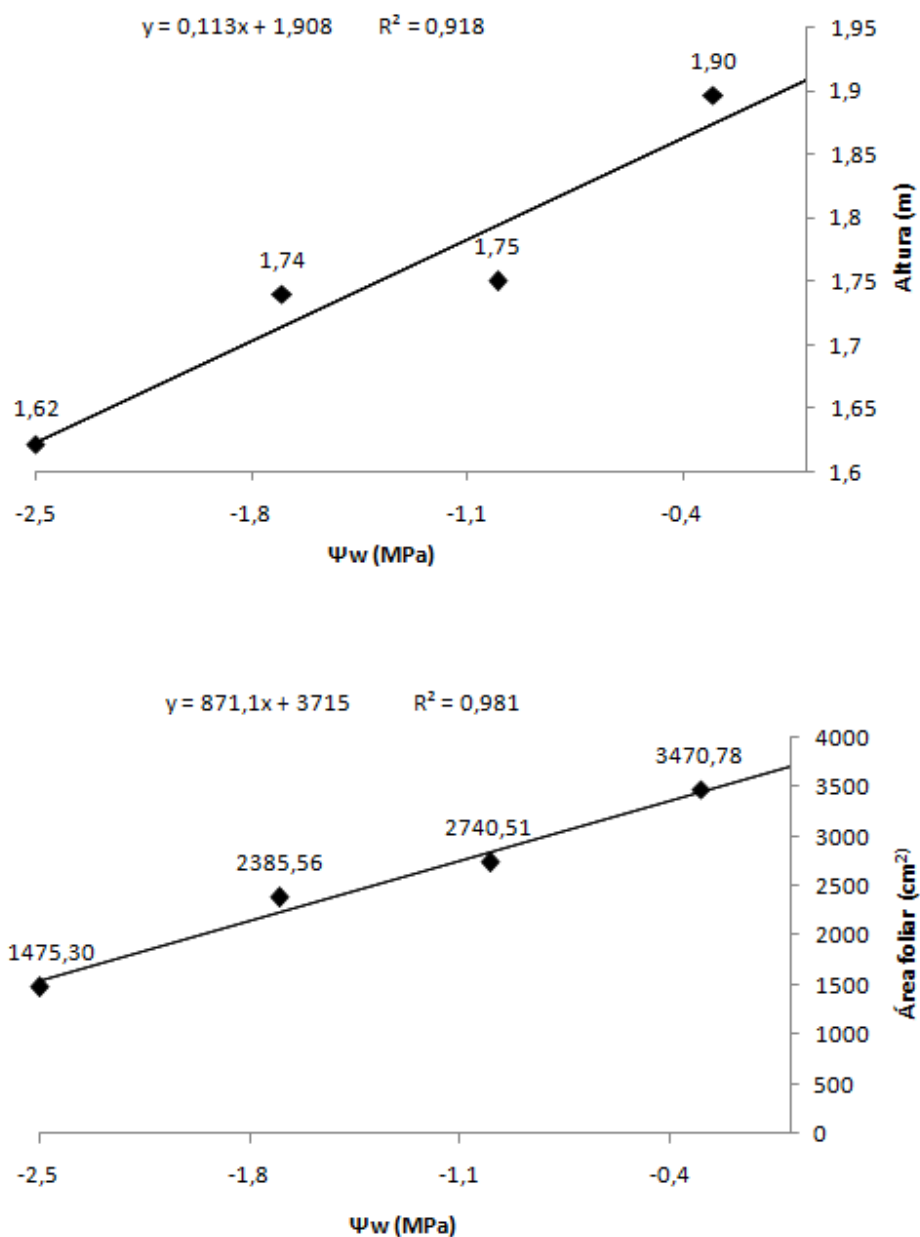
Desta forma, nota-se que a altura das plantas reduziu linearmente com a diminuição do  $\Psi_w$  (Figura 13), apresentando decréscimo de 14% entre os tratamentos -0,3 MPa (1,89 m) e -2,5 MPa (1,62 m).

O crescimento das plantas consiste basicamente em divisão celular, seguida por crescimento celular, causando alterações irreversíveis no tamanho das mesmas. Porém, tanto a divisão como a expansão celular apresentam exigências específicas de luz, água, minerais, temperatura, dentre outros recursos (HERMS; MATTSON, 1992). Pode-se observar que a supressão da irrigação provocou perda de turgescência celular e conseqüentemente, diminuição no processo de crescimento. Além disso, cessar o crescimento pode significar economia de energia para as funções vitais da planta.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância da regressão para altura (AL, m), diâmetro de caule (DC, cm), número de folhas (NF, un) e área foliar (AF, cm<sup>2</sup>) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio			
		AL	DC	NF	AF
<b>Regressão linear</b>	1	0,20736**	0,00067 <sup>ns</sup>	58,24119 <sup>ns</sup>	12064013,1635**
<b>Regressão quadrática</b>	1	0,00126 <sup>ns</sup>	0,00762 <sup>ns</sup>	25,44327 <sup>ns</sup>	48593,25023 <sup>ns</sup>
<b>Regressão cúbica</b>	1	0,01770 <sup>ns</sup>	0,00057 <sup>ns</sup>	246,28027 <sup>ns</sup>	259825,10241 <sup>ns</sup>
<b>Tratamentos</b>	3	0,07544	0,00295	109,98824	4124143,83873
<b>Resíduo</b>	20	0,01358	0,00822	814,32660	269903,80925
<b>CV (%)</b>		6,65	12,23	17,75	20,63

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ), <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ ), pelo teste F. FV= Fonte de variação. GL= Grau de liberdade.



**Figura 13.** Altura e área foliar de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

Vazin (2013) avaliou os efeitos da deficiência hídrica em *Cuminum cyminum* L. e verificou que o estresse hídrico severo reduziu a altura das plantas em 23%, comparado com o tratamento controle. Redução na altura de plantas submetidas à deficiência hídrica também foi observada por Jaleel et al. (2008) em *Catharanthus roseus* L., Bettaieb et al. (2009) em *Salvia officinalis* L., Azhar et al. (2011) em *Trachyspermum ammi* L. e Metwally et al. (2013) em *Callendula officinalis* L.

O comportamento linear decrescente observado para área foliar em relação ao  $\Psi_w$  (Figura 13), revela redução de área foliar de mais de 50% entre -0,3 MPa (3470,78 cm<sup>2</sup>) e -2,5 MPa (1475,30 cm<sup>2</sup>), evidenciando perda da área foliar fotossinteticamente ativa.

Segundo Santos e Carlesso (1998) a redução no índice de área foliar em situações de deficiência hídrica pode estar relacionada com diminuição no tamanho individual das folhas, com menor produção de folhas ou abscisão foliar, além disso, as plantas podem alterar a interceptação da radiação solar através de modificações na exposição e duração da área foliar, como pode ter ocorrido neste trabalho, pois não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para a variável NF, indicando que caso tenha ocorrido abscisão foliar decorrente da senescência, esta não foi significativa.

Resultados similares foram observados por Khalid et al. (2010) ao submeteram *Pelargonium odoratissimum* L. à quatro níveis de deficiência hídrica representados por diferentes capacidades de água no campo. Já Baghalian et al. (2011) não encontraram diferença significativa para o índice de área foliar em *Matricaria recutita* L. submetida a quatro níveis de umidade no solo.

As variáveis massa de folhas frescas (MFF), massa de caules frescos (MCF) e massa total fresca (MTF) apresentaram diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F e a variável volume de raiz (VR) apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância da regressão para massa das folhas frescas (MFF, g), massa de caules frescos (MCF, g), massa de raízes frescas (MRF, g), massa total fresca (MTF, g) e volume de raiz (VR, cm<sup>3</sup>) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio				
		MFF	MCF	MRF	MTF	VR
<b>Regressão linear</b>	1	6305,37332**	2370,99269**	17,95038 <sup>ns</sup>	15341,90951**	84,44819 <sup>ns</sup>
<b>Regressão quadrática</b>	1	1,41567**	271,40607 <sup>ns</sup>	22,16643 <sup>ns</sup>	399,70938 <sup>ns</sup>	167,12966*
<b>Regressão cúbica</b>	1	65,83703 <sup>ns</sup>	342,96113 <sup>ns</sup>	16,15900 <sup>ns</sup>	939,61054 <sup>ns</sup>	15,88982 <sup>ns</sup>
<b>Tratamentos</b>	3	2124,20867	995,11997	18,75860	5560,40981	89,15589
<b>Resíduo</b>	20	45,75567	109,37483	17,10956	298,44244	39,76498
<b>CV (%)</b>		15,68	15,28	42,07	14,23	36,29

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ), \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ), <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ ), pelo teste F. FV= Fonte de variação. GL= Grau de liberdade.

O modelo de regressão linear foi o que melhor se ajustou ao conjunto de dados das variáveis MFF ( $R^2= 0,99$ ), MCF ( $R^2= 0,78$ ) e MTF ( $R^2= 0,91$ ), podendo-se observar decréscimo linear nos resultados destas variáveis em função da redução do  $\Psi_w$  (Figura 14).

Bettaieb et al. (2009) verificaram redução de 35,33% e 74,60%, na massa fresca de sálvia (*Salvia officinalis* L.) submetida à deficiência hídrica moderada e severa, respectivamente, inferindo que este decréscimo pode ser resultado de uma alocação preferencial de produção de biomassa para as raízes.

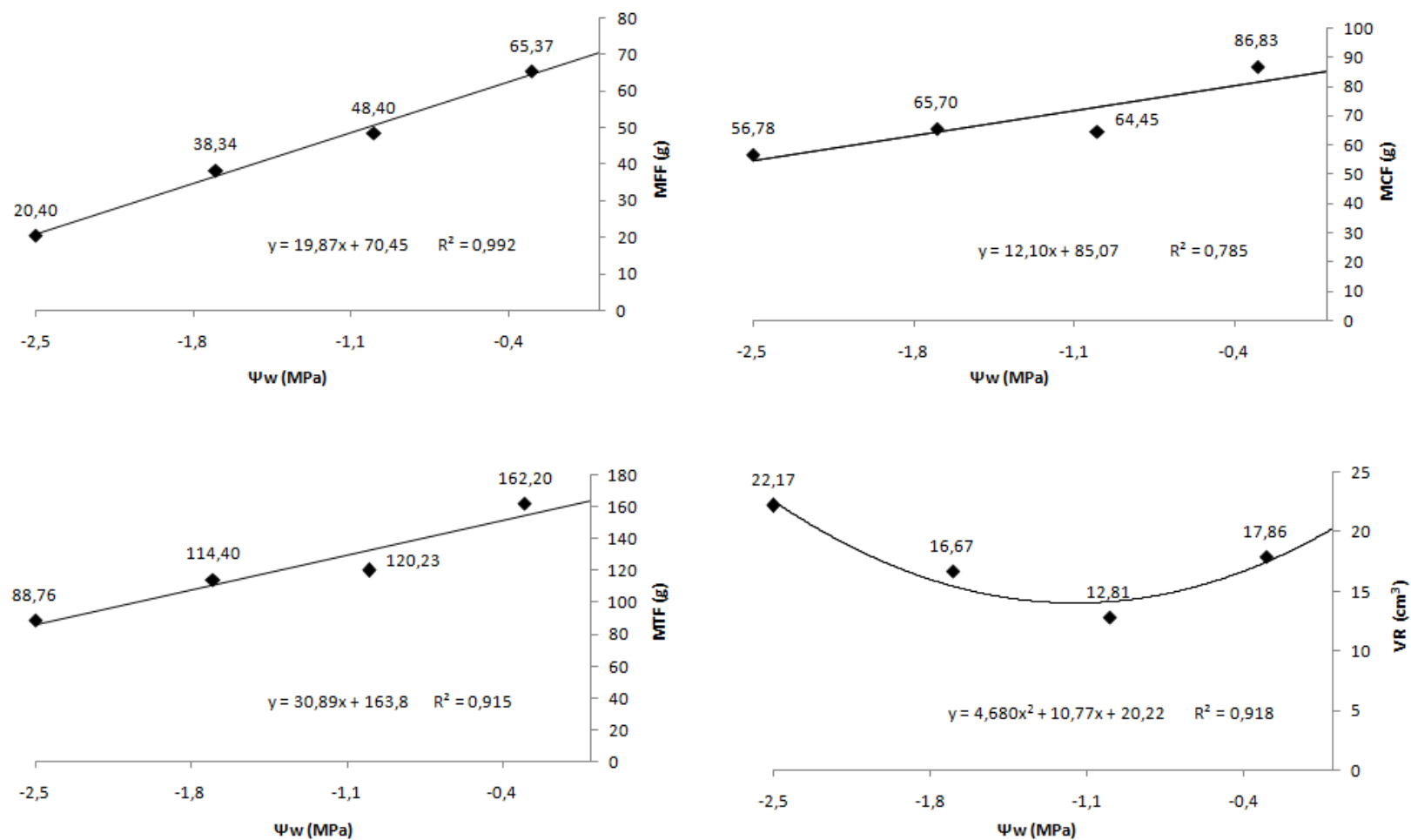
Azhar et al. (2011) submeteram plantas de *Trachyspermum ammi* L. a 3 níveis de capacidade de campo e, ao compararem os tratamentos com 100% (2,24 g) e 60% (1,09 g) da capacidade de campo observaram redução de mais de 50% na massa fresca.

Para a variável VR o modelo matemático que melhor se ajustou ao conjunto de dados foi o polinomial de 2º grau (Figura 14), com coeficiente de determinação de  $R^2= 0,92$ . O valor mínimo estimado a partir da equação foi de 14,02 cm<sup>3</sup> sob -1,15 MPa. Além disso, pode-se verificar aumento de 25% no VR das plantas submetidas ao  $\Psi_w$  de -2,5 MPa (22,16 cm<sup>3</sup>) em relação a -0,3 MPa (17,86 cm<sup>3</sup>).

Taiz e Zeiger (2004) explicam que com o avanço do déficit hídrico as plantas tendem a desenvolver seu sistema radicular buscando alcançar camadas mais profundas de solo que contenham umidade, sendo esta estratégia uma linha de defesa contra a seca.

A maior incidência de raízes também foi observada por Jaleel et al. (2008) em duas variedades de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. submetidas à deficiência hídrica.





**Figura 14.** Massa de folhas frescas (MFF), massa de caules frescos (MCF), massa total fresca (MTF) e volume de raiz (VR) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

Com o auxílio da análise de variância da regressão verificou-se diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F (Tabela 4) para as variáveis massa de caules secos (MCS), massa de raízes secas (MRS) e massa total seca (MTS).

Para as variáveis MCS e MTS o modelo matemático que melhor se ajustou ao conjunto de dados foi o polinomial de 2º grau (Figura 15), com coeficientes de determinação de  $R^2= 0,88$  e  $R^2= 0,89$ , respectivamente. O valor mínimo estimado a partir da equação para MCS foi de 23,50 g sob -1,13 MPa e para MTS foi de 37,99 g sob -1,10 MPa.

O modelo de regressão linear foi o que melhor se ajustou ao conjunto de dados da variável MRS ( $R^2= 0,69$ ), observando-se aumento linear da massa de raízes secas em função da redução do  $\Psi_w$  (Figura 15), o que está de acordo com o incremento no volume de raiz (VR) observado anteriormente.

Não se observou diferença significativa entre os tratamentos em relação massa de folhas secas (MFS). Este resultado pode ser associado ao curto período em que as plantas foram submetidas à deficiência hídrica, máximo de oito dias.

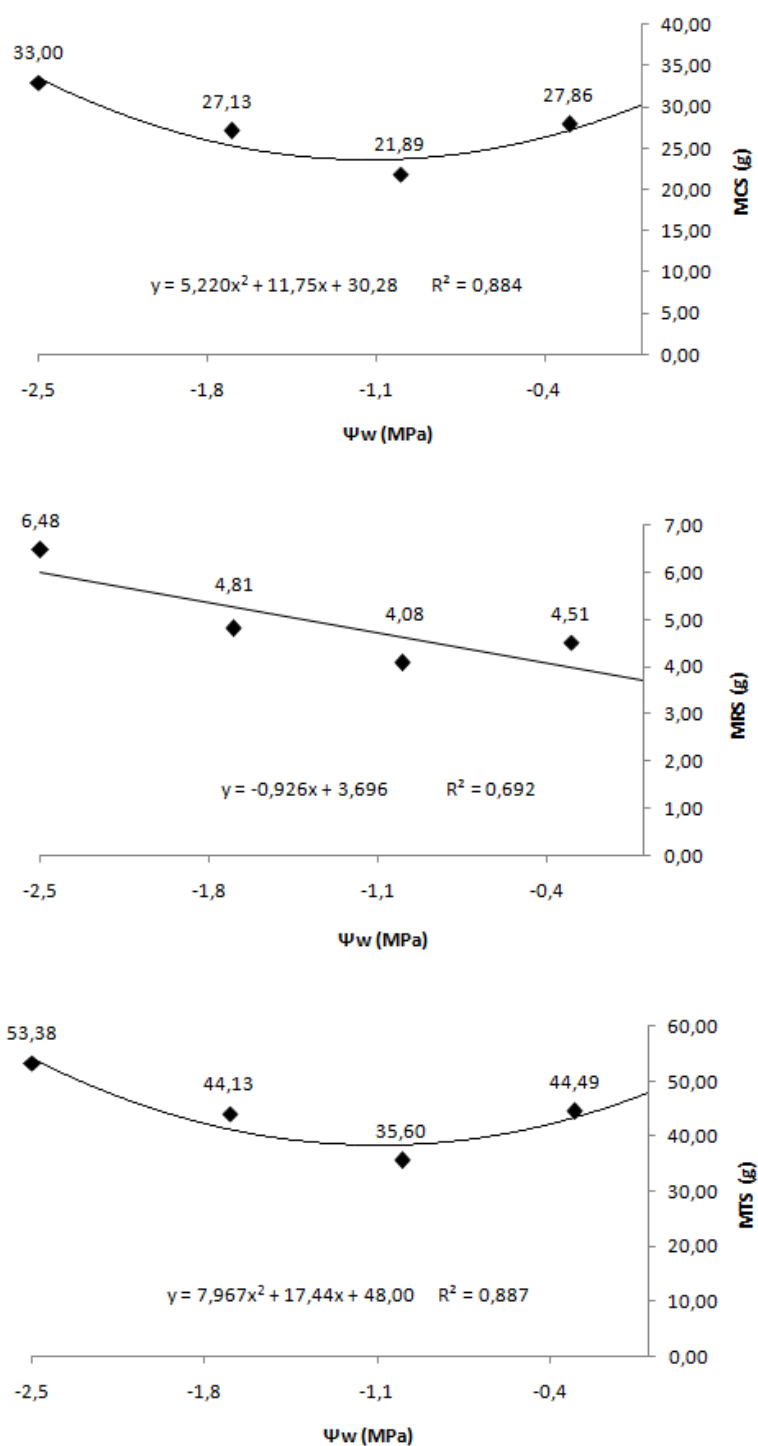
Marchese et al. (2010) estudaram o efeito da deficiência hídrica (DH) em plantas de *Artemisia annua* L. e não encontraram diferença significativa para o acúmulo de biomassa seca entre os tratamentos com deficiência hídrica severa (62 e 86 horas de DH) e o tratamento controle. Pinto et al. (2014) não encontraram diferença significativa na massa seca de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) submetido a deficiência hídrica acentuada (50% da demanda e intervalo de irrigações de 7 dias) na segunda etapa no experimento.

Já Bettaieb et al. (2009) verificaram que a massa seca de sálvia (*Salvia officinalis* L.) submetida à deficiência hídrica moderada e severa apresentou redução de 17,85% e 26,33%, respectivamente. Khalid et al. (2010) também encontraram redução na massa seca de gerânio (*Pelargonium odoratissimum* L.) em condições de estresse hídrico.

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância da regressão para massa das folhas secas (MFS, g), massa de caules secos (MCS, g), massa de raízes secas (MRS, g) e massa total seca (MTS, g) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio			
		MFS	MCS	MRS	MTS
<b>Regressão linear</b>	1	18,79421 <sup>ns</sup>	128,15747 <sup>ns</sup>	13,18817 <sup>*</sup>	372,00556 <sup>ns</sup>
<b>Regressão quadrática</b>	1	26,38772 <sup>ns</sup>	210,51858 <sup>*</sup>	6,62609 <sup>ns</sup>	493,74070 <sup>*</sup>
<b>Regressão cúbica</b>	1	10,43839 <sup>ns</sup>	33,45117 <sup>ns</sup>	0,01713 <sup>ns</sup>	83,63918 <sup>ns</sup>
<b>Tratamentos</b>	3	18,54011	124,04241	6,61047	316,46181
<b>Resíduo</b>	20	6,62588	41,00734	2,45575	106,91944
<b>CV (%)</b>		21,53	23,31	31,53	23,29

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ). <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ ), pelo teste F. FV= Fonte de variação. GL= Grau de liberdade.



**Figura 15.** Massa de caules secos (MCS), massa de raízes secas (MRS) e massa total seca (MTS) de plantas de *Varronia curassavica* submetida à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

### 7.1.1. Análises de crescimento

A Tabela 5 apresenta o resumo da análise de variância da regressão para o efeito dos diferentes potenciais hídricos no xilema da folha ( $\Psi_w$ ) em relação as análises de crescimento em *V. curassavica*, podendo-se observar diferenças significativas aos níveis de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F para a variável razão de área foliar (RAF).

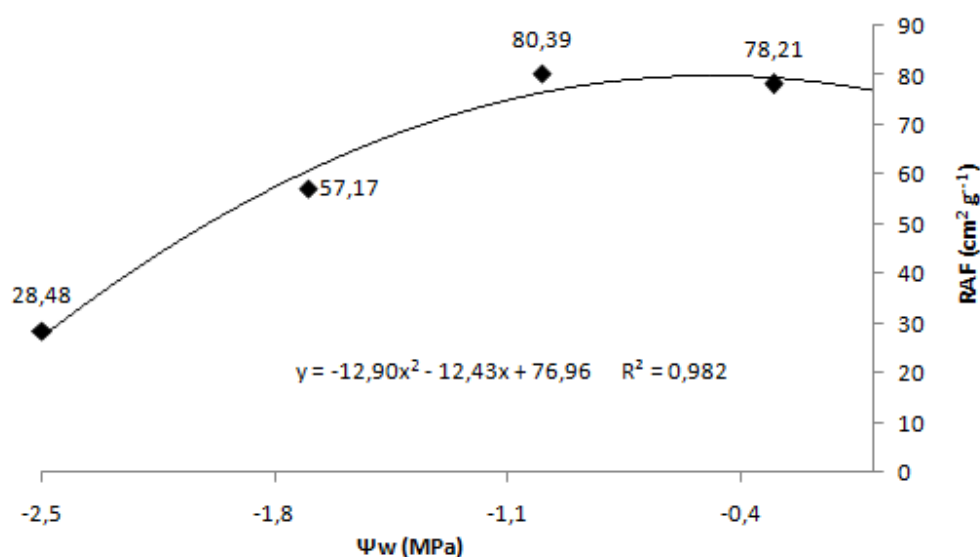
**Tabela 5.** Resumo da análise de variância da regressão para as análises de crescimento: razão de massa foliar (RMF,  $\text{g cm}^{-2}$ ) e razão de área foliar (RAF,  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio	
		RMF	RAF
<b>Regressão linear</b>	1	0,00012 <sup>ns</sup>	8917,73794 <sup>**</sup>
<b>Regressão quadrática</b>	1	0,00047 <sup>ns</sup>	1428,59674 <sup>*</sup>
<b>Regressão cúbica</b>	1	0,00013 <sup>ns</sup>	118,97946 <sup>ns</sup>
<b>Tratamentos</b>	3	0,00024	3488,43805
<b>Resíduo</b>	20	0,00036	219,52601
<b>CV (%)</b>		7,01	24,26

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ), \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 < p < .05$ ), <sup>ns</sup> não significativo ( $p >= .05$ ), pelo teste F. FV= Fonte de variação. GL= Grau de liberdade.

O modelo matemático que melhor se ajustou ao conjunto de dados desta variável foi o polinomial de 2º grau ( $R^2 = 0,98$ ), sendo o valor máximo estimado a partir da equação de  $85,94 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$  sob  $\Psi_w$  de aproximadamente -0,48 MPa (Figura 16).

A RAF sob  $\Psi_w$  -0,3 MPa ( $78,21 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ) diferiu significativamente dos demais potenciais apresentando redução de mais de 60% em comparação ao -2,5 MPa ( $28,48 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ).



**Figura 16.** Razão de área foliar de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

Esta variável define a área foliar útil para a fotossíntese, representada pela relação entre a área foliar e a massa seca total da planta (BENINCASA, 2003). Assim, observa-se que o decréscimo do CRA sob os menores  $\Psi_w$  avaliados ocasionou diminuição da RAF. Havendo menor área foliar fotossinteticamente ativa disponível, as plantas apresentaram redução nos parâmetros biométricos de massa fresca (Figura 14).

Resultados similares foram observados por Coscolin (2012) em manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) cultivado sob diferentes tratamentos de deficiência hídrica e em três épocas de amostragem, sendo que os tratamentos com estresse hídrico apresentaram RAF menores que o controle, em 2 épocas de amostragem.

A razão de massa foliar (RMF) compreende a razão entre a massa seca acumulada nas folhas e a massa seca total da planta (BENINCASA, 2003), porém nas condições deste experimento não foi observada diferença significativa entre os potenciais hídricos no xilema da folha para esta variável.

## 7.2. Trocas gasosas

Os resultados evidenciaram alterações nas trocas gasosas de plantas de *V. curassavica* em função da supressão da irrigação. Com o auxílio da análise de variância da regressão verificou-se diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F (Tabela 6) para a taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> (*A*), condutância estomática (*gs*) e taxa de transpiração (*E*).

Para estas variáveis, observa-se que o modelo matemático que melhor se ajustou ao conjunto de dados foi o polinomial de 2º grau (Figura 17), com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de 0,95 (*A*), 0,99 (*gs*) e 0,99 (*E*). Os valores mínimos estimados a partir das equações foram de 5,73  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para *A*, 0,0445  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para *gs* e 1,128  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para *E*, todos sob  $\Psi_w$  de aproximadamente -1,7 MPa.

Comportamento similar, com redução significativa na fotossíntese líquida, condutância estomática e transpiração, foi observado por Lother et al. (2014) ao avaliar o efeito da seca em plantas de *Aspalathus linearis*. Assim como por Pacheco et al. (2011) que verificou que a interrupção da irrigação por seis dias provocou decréscimo significativo nas trocas gasosas de *Calendula officinalis* L..

Lawlor e Cornic (2002) destacam que a diminuição progressiva do CRA reduz *A*, podendo eventualmente inibi-la, além de ocorrer à liberação de CO<sub>2</sub> líquido proveniente da respiração. Porém nas condições deste trabalho, observou-se que a queda do CRA provocado pelos baixos potenciais hídricos no xilema da folha não provocou grandes alterações nas trocas gasosas de *V. curassavica*, pois os tratamentos submetidos à supressão da irrigação não diferiram entre si, sendo diferentes estatisticamente apenas do tratamanto controle (-0,3 MPa) (Figura 17).

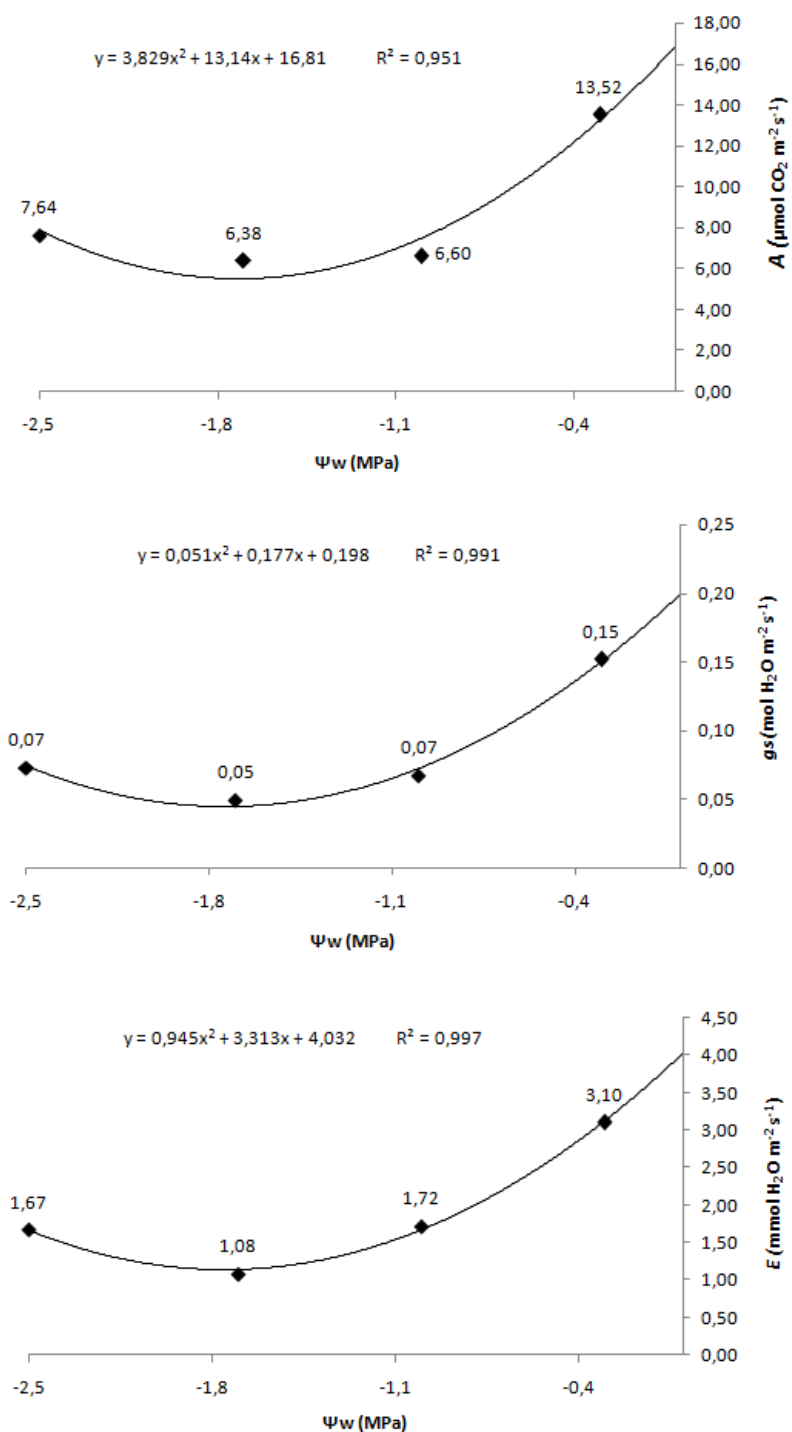
Azhar et al. (2011) verificaram incremento na taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> de plantas de *Trachyspermum ammi* L. ao compararem esta variável sob condições de 80% e 60% da capacidade de campo, inferindo que esta espécie consegue manter a atividade fotossintética mesmo com redução do CRA.

**Tabela 6.** Resumo da análise de variância da regressão para taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> (*A*, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), condutância estomática (*gs*, mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (*Ci*, μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>), taxa de transpiração (*E*, mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), eficiência no uso de água (EUA, mmol mol<sup>-1</sup>) e eficiência instantânea da carboxilação (EiC, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) em plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio					
		<i>A</i>	<i>gs</i>	<i>Ci</i>	<i>E</i>	EUA	EiC
<b>Regressão linear</b>	1	95,90520**	0,01940**	3383,41624 <sup>ns</sup>	7,32000**	4,71431 <sup>ns</sup>	0,00083 <sup>ns</sup>
<b>Regressão quadrática</b>	1	100,38664**	0,01745**	1054,37561 <sup>ns</sup>	5,86666**	0,16990 <sup>ns</sup>	0,00115 <sup>ns</sup>
<b>Regressão cúbica</b>	1	8,11934 <sup>ns</sup>	0,00018 <sup>ns</sup>	6585,36086 <sup>ns</sup>	0,07271 <sup>ns</sup>	9,85437*	0,00172*
<b>Tratamentos</b>	3	68,13706	0,01234	3674,38424	4,41979	4,91286	0,00123
<b>Resíduo</b>	20	3,88957	0,00059	1820,02234	0,26739	2,11783	0,00029
<b>CV (%)</b>		25,86	28,50	22,22	27,31	30,35	36,36

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ), \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ), <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ ), pelo teste F. FV= Fonte de variação. GL= Grau de liberdade.





**Figura 17.** Taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e taxa de transpiração ( $E$ ) em plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

### 7.3. Teor relativo de clorofila

Com o auxílio da análise de variância da regressão (Tabela 7) não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para os teores relativos de clorofila.

**Tabela 7.** Resumo da análise de variância da regressão para teor relativo de clorofila (SPAD) em folhas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio
		SPAD
<b>Regressão linear</b>	1	2,20016 <sup>ns</sup>
<b>Regressão quadrática</b>	1	7,12548 <sup>ns</sup>
<b>Regressão cúbica</b>	1	21,25643 <sup>ns</sup>
<b>Tratamentos</b>	3	10,19402
<b>Resíduo</b>	20	6,92160
<b>CV (%)</b>		6,16

<sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ ), pelo teste F. FV= Fonte de variação. GL= Grau de liberdade.

Egert e Tevini (2002) também não encontraram diferenças significativas nos teores de clorofila em cebolinha (*Allium schoenoprosom*) submetida a condições de seca e inferiram como ausência de estresse oxidativo. Smirnoff (1993) explica que as plantas podem proteger-se da destruição de pigmentos fotossintéticos provocada pelo estresse hídrico, sintetizando substâncias antioxidantes e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes.

### 7.4. Conteúdo relativo de água

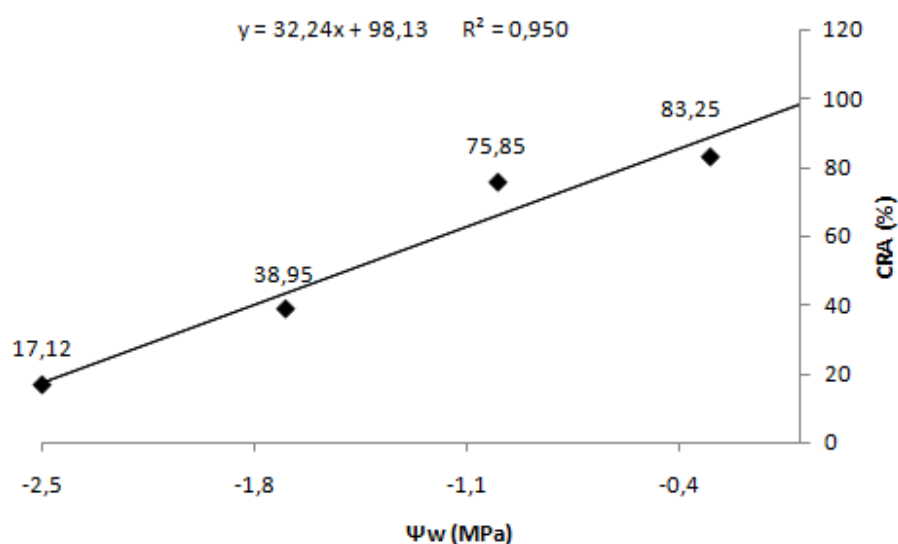
Por intermédio da análise de variância da regressão pode-se verificar diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F para o efeito dos diferentes potenciais hídricos no xilema da folha ( $\Psi_w$ ) em relação ao conteúdo relativo de água (CRA) em tecidos foliares de *V. curassavica* (Tabela 8).

**Tabela 8.** Resumo da análise de variância da regressão para conteúdo relativo de água (CRA, %) em discos foliares de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio
		CRA
<b>Regressão linear</b>	1	8304,26597**
<b>Regressão quadrática</b>	1	155,96744 <sup>ns</sup>
<b>Regressão cúbica</b>	1	298,09326 <sup>ns</sup>
<b>Tratamentos</b>	3	2919,44222
<b>Resíduo</b>	8	191,68458
<b>CV (%)</b>		25,74

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ), <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ ), pelo teste F. FV= Fonte de variação. GL= Grau de liberdade.

O modelo de regressão linear foi o que melhor se ajustou ao conjunto de dados ( $R^2 = 0,95$ ), evidenciando decréscimo linear da variável CRA em função da redução do  $\Psi_w$  (Figura 18).



**Figura 18.** Conteúdo relativo de água (CRA) em discos foliares de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

Resultados similares foram observados por Cunhua et al. (2011) em *Chenopodium album* L. submetido a quatro níveis de água no solo. Os autores observaram que quanto maior o nível de estresse hídrico, menor o CRA das plantas.

Pacheco et al. (2011) observaram que o CRA de plantas de *Calendula officinalis* L. permaneceu acima de 80% após três e seis dias de suspensão da irrigação, apresentando redução significativa (48,5%) apenas aos nove dias de deficiência hídrica.

Em contrapartida, Pirzad et al. (2011) não encontraram diferença significativa entre os tratamentos em plantas de *Matricaria chamomilla* L. submetidas a quatro regimes de irrigação, inferindo que este comportamento pode indicar que a espécie seja tolerante à seca.

O conteúdo relativo de água é utilizado na avaliação do estado hídrico das plantas, sendo um bom indicador deste tipo de estresse por se relacionar a reduções no teor de água dos tecidos. Desta forma, pode-se considerar como limite de CRA mínimo aquele em que ocorrem alterações irreversíveis no metabolismo das plantas, porém, este fator é dependente do tempo e não pode ser facilmente definido em valores (LAWLOR; CORNIC, 2002).

Lambers et al. (1998) esclarecem que é inevitável a perda de água, quando os estômatos abrem para permitir a fotossíntese, e se o abastecimento de água pelas raízes não corresponder ao que é perdido pelas folhas, ocorre a diminuição do CRA.

No entanto, conforme observado nos resultados de trocas gasosas, o decréscimo no conteúdo relativo de água não provocou alterações na condutância estomática ( $g_s$ ), taxa assimilatória líquida de  $CO_2$  ( $A$ ) e taxa de transpiração ( $E$ ) entre os tratamentos submetidos à supressão da irrigação (-1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa). Este resultado pode ser justificado pelo fato das coletas para a análise de CRA e as avaliações de trocas gasosas terem sido realizadas em horários diferentes, pois devido ao grande volume de análises não foi possível realizar as avaliações simultaneamente.

## **7.5. Análises bioquímicas**

A Tabela 9 apresenta o resumo da análise de variância da regressão para o efeito dos diferentes potenciais hídricos no xilema da folha ( $\Psi_w$ ) em relação às variáveis bioquímicas, podendo-se observar diferenças significativas ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F para os teores de proteínas solúveis totais (PT), açúcares totais (AT), prolina (PR) e peroxidação de lipídeos (PL), evidenciando alterações no metabolismo de *V. curassavica* em função da supressão da irrigação.

Para os teores de PT e AT o modelo matemático polinomial de 2º grau foi o que melhor se ajustou ao conjunto de dados (Figura 19), com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de 0,99 e 0,81, respectivamente. O teor mínimo de proteínas totais (PT) estimado a partir da equação foi de  $0,187 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  sob  $\Psi_w$  de  $-0,92 \text{ MPa}$ . Para açúcares totais (AT) a concentração máxima estimada foi de  $0,63 \text{ mg AT g}^{-1} \text{ MF}$  sob  $\Psi_w$  de  $-0,75 \text{ MPa}$ .

Observou-se incremento na concentração de PT de 84% entre os  $\Psi_w$   $-0,3 \text{ MPa}$  ( $217,637 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e  $-2,5 \text{ MPa}$  ( $400,687 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 19). De acordo com Soares e Machado (2007) e Reis (2009) várias pesquisas constataram que para enfrentar estresses ambientais, as plantas ativam vários genes envolvidos tanto na inibição como no acúmulo de proteínas específicas associadas ao estresse. Dentre as proteínas que são acumuladas principalmente sob estresse por seca, condições anaeróbicas e baixas temperaturas estão as Heat-shock proteins (HsPs), pertencentes a um grupo maior de moléculas chamadas de chaperonas (COCA et al., 1994).

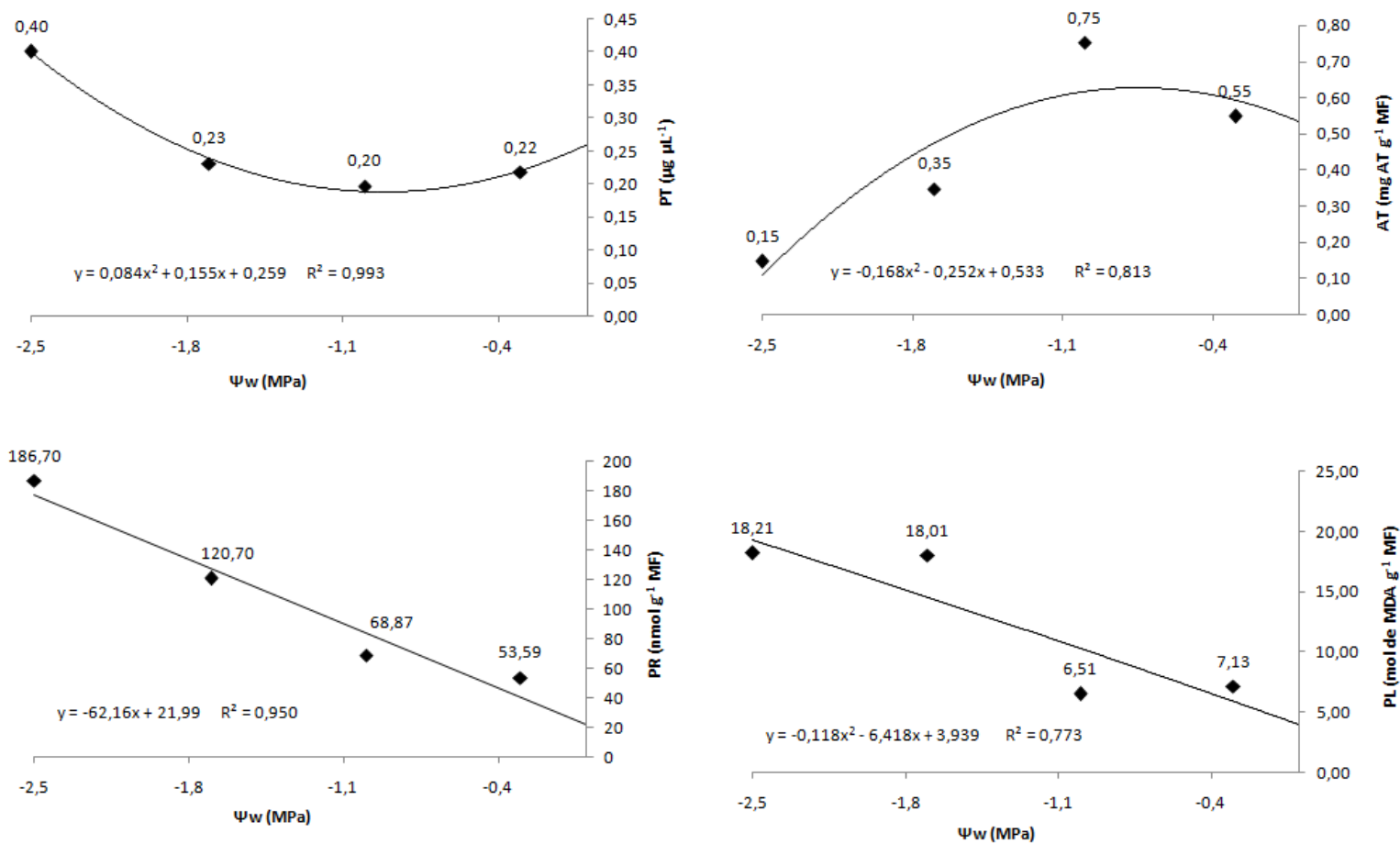
As concentrações de AT apresentaram redução de 37% em  $-1,7 \text{ MPa}$  ( $0,348 \text{ mg AT g}^{-1} \text{ MF}$ ) e de 73% em  $-2,5 \text{ MPa}$  ( $0,147 \text{ mg AT g}^{-1} \text{ MF}$ ), quando comparadas ao  $-0,3 \text{ MPa}$  ( $0,548 \text{ mg AT g}^{-1} \text{ MF}$ ) (Figura 19). Melo et al. (2007) também observaram diminuição na concentração de açúcares solúveis em folhas e raízes de setária sob deficiência hídrica e inferiu que esta diminuição pode estar associada ao consumo destas substâncias para a manutenção da sobrevivência das plantas, uma vez que a atividade fotossintética também foi reduzida.

O modelo de regressão linear foi o que melhor se ajustou ao conjunto de dados de PR ( $R^2=0,95$ ) e PL ( $R^2=0,77$ ), podendo-se observar aumento linear nos resultados destas variáveis em função da redução do  $\Psi_w$  (Figura 19).

**Tabela 9.** Resumo da análise de variância da regressão dos teores de proteínas solúveis totais (PT,  $\mu\text{g mL}^{-1}$  alíquota), açúcares totais (AT,  $\text{mg AT g}^{-1}$  MF), prolina (PR,  $\text{nmol g}^{-1}$  MF), peroxidação de lipídeos (PL,  $\text{mol de MDA g}^{-1}$  MF), atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, U SOD  $\mu\text{g Prot.}^{-1}$ ) e peroxidase (POX,  $\mu\text{Kat mg Prot}^{-1}$ ) em tecidos foliares de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio					
		PT	AT	PR	PL	SOD	POX
<b>Regressão linear</b>	1	0,10178**	0,77551**	61062,47127*	600,34706*	8997,17344 <sup>ns</sup>	8,09428 <sup>ns</sup>
<b>Regressão quadrática</b>	1	0,05423*	0,24534 <sup>ns</sup>	3858,67261 <sup>ns</sup>	1,00488 <sup>ns</sup>	7169,63481 <sup>ns</sup>	0,20703 <sup>ns</sup>
<b>Regressão cúbica</b>	1	0,00207 <sup>ns</sup>	0,19676 <sup>ns</sup>	150,39229 <sup>ns</sup>	164,80410 <sup>ns</sup>	7409,14257 <sup>ns</sup>	67,02641 <sup>ns</sup>
<b>Tratamentos</b>	3	0,05269	0,40587	21690,51206	255,38535	7858,65027	25,10924
<b>Resíduo</b>	20	0,00714	0,05701	7605,24989	74,30666	2299,33974	17,97575
<b>CV (%)</b>		32,31	53,18	81,15	69,17	46,59	57,27

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ), \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ), <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ ), pelo teste F. FV= Fonte de variação. GL= Grau de liberdade.



**Figura 19.** Teores de proteínas solúveis totais (PT), açúcares totais (AT), prolina (PR) e peroxidação de lipídeos (PL) em tecidos foliares de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

Os teores de prolina encontrados em -1,7 MPa e -2,5 MPa foram superiores 2,25 vezes (120,704 nmol g<sup>-1</sup> MF) e 3,5 vezes (186,702 nmol g<sup>-1</sup> MF), respectivamente, ao apresentado em -0,3 MPa (53,594 nmol g<sup>-1</sup> MF).

O aumento na concentração de prolina em plantas submetidas à supressão da irrigação pode ser decorrente de regulação osmótica, sendo este um importante mecanismo de tolerância à seca, capaz de proteger a integridade celular permitindo que as células continuem a se expandir e as plantas não cessem o crescimento, além de ajustamentos estomáticos e fotossintéticos (KUMAR; SINGH, 1998).

Alvarenga et al. (2011) também encontraram incremento nos teores de prolina em *Lippia sidoides* Cham., conforme o aumento do período de estresse hídrico, sendo que aos 8 dias de estresse, o teor deste metabólito foi, aproximadamente, 13 vezes superior ao tratamento controle.

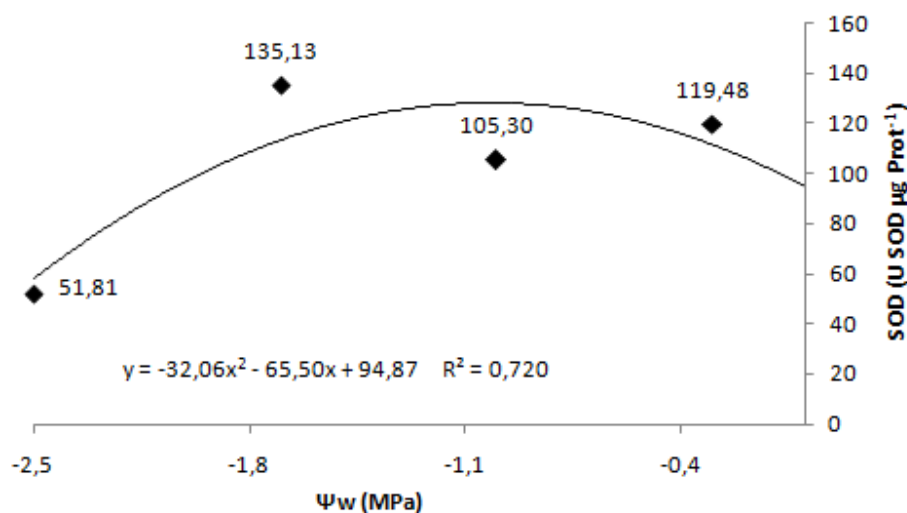
Nas análises de peroxidação de lipídeos (PL) observa-se que os conteúdos de MDA encontrados em -1,7 MPa (18,01 mol de MDA g<sup>-1</sup> MF) e -2,5 MPa (18,205 mol de MDA g<sup>-1</sup> MF) foram, aproximadamente, 2,5 vezes superiores ao apresentado em -0,3 MPa (7,128 mol de MDA g<sup>-1</sup> MF) (Figura 19). O MDA (aldeído malônico) é um produto da decomposição de ácidos graxos das biomembranas e é uma forma de atestar a presença de radicais livres nas plantas. Sua ocorrência em plantas não estressadas (-0,3 MPa) pode ser atribuída aos distúrbios normais que ocorrem nas rotas metabólicas que envolvem reações de transferência de elétrons, como na fase fotoquímica da fotossíntese (MITTLER, 2002; CASTRO et al., 2011).

Cunhua et al. (2011) encontraram incremento no conteúdo de MDA de plantas de *Chenopodium album* L. submetidas a deficiência hídrica. No entanto, este incremento não apresentou relação linear com a intensidade do estresse, decrescendo sob estresse moderado (10 dias) e aumentando sob estresse severo (15 dias). Os autores sugerem que este comportamento pode indicar adaptação do metabolismo da planta para proteção a intensidade do estresse.

Para a atividade da enzima SOD, o modelo matemático que melhor se ajustou ao conjunto de dados foi polinomial de 2º grau (Figura 20), com coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) de 0,72. A máxima atividade específica da SOD (128,32 U SOD µg Prot.<sup>-1</sup>), estimada a partir da equação da reta, foi encontrada sob  $\Psi_w$  de -1,02 MPa. Após a máxima



atividade, observa-se redução da atividade da SOD de mais de 50% quando as plantas estão sob -2,5 MPa (51,814).



**Figura 20.** Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em tecidos foliares de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

Resultados similares foram observados por Cunhua et al. (2011) avaliando o efeito da deficiência hídrica em *Chenopodium album* L.. Eles observaram incremento na atividade da SOD sob deficiência hídrica moderada (10 dias) e decréscimo quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica severa (15 dias).

Segundo Broetto et al. (2002) pode-se considerar este ponto de máxima atividade como uma situação limite de resposta da SOD ao estresse oxidativo.

## 7.6. Isótopos estáveis

Por intermédio do resumo da análise de variância da regressão para o efeito dos diferentes potenciais hídricos no xilema da folha ( $\Psi_w$ ) com relação à abundância de carbono e nitrogênio foliar em *V. curassavica* verificou-se diferenças significativas ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F para a quantidade de nitrogênio (N) e para as razões isotópicas de carbono ( $\delta^{13}C$ ) e nitrogênio ( $\delta^{15}N$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Resumo da análise de variância da regressão para carbono total (C, %), nitrogênio total (N, %) e para as razões isotópicas de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) em folhas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

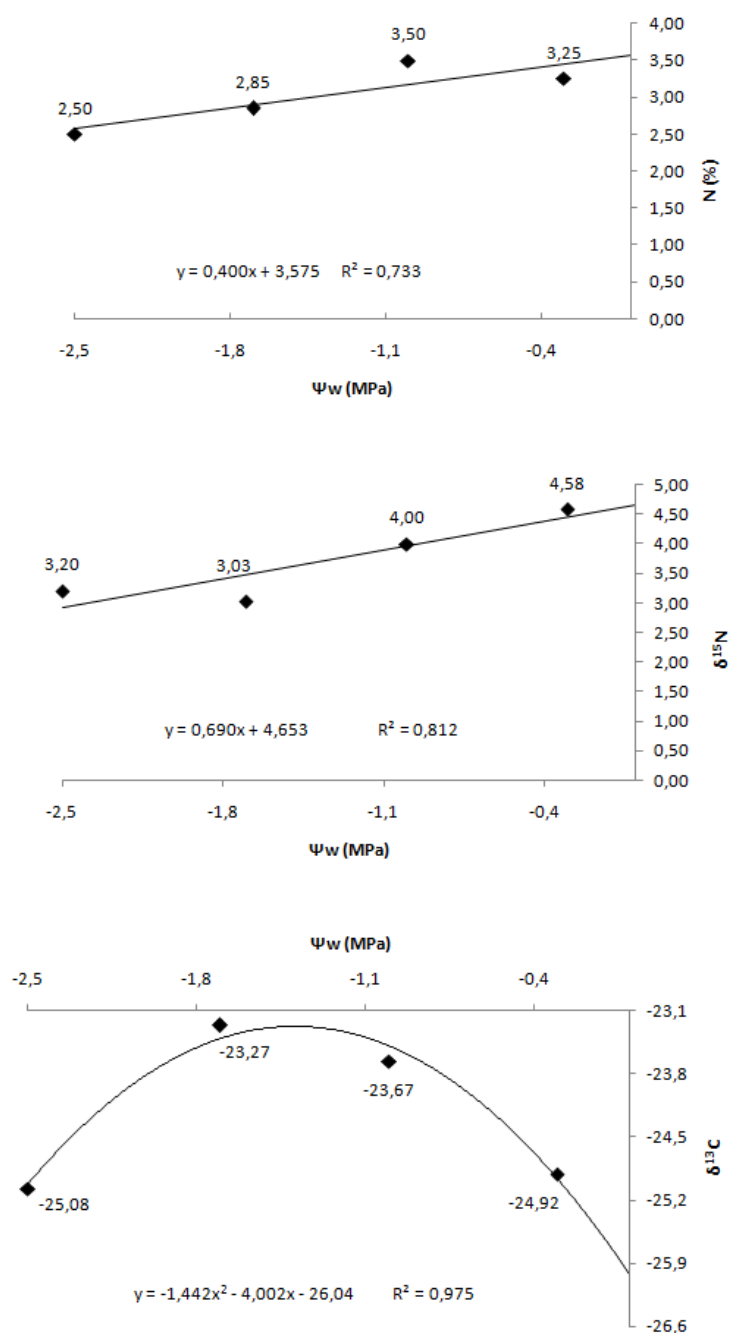
FV	GL	Quadrado Médio			
		C	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
<b>Regressão linear</b>	1	25,20833 <sup>ns</sup>	2,52300**	0,00300 <sup>ns</sup>	7,85408*
<b>Regressão quadrática</b>	1	2,94000 <sup>ns</sup>	0,54000 <sup>ns</sup>	14,10667**	0,84375 <sup>ns</sup>
<b>Regressão cúbica</b>	1	56,03333 <sup>ns</sup>	0,43200 <sup>ns</sup>	0,56033 <sup>ns</sup>	0,69008 <sup>ns</sup>
<b>Tratamentos</b>	3	28,06056	1,16500	4,89000	3,12931
<b>Resíduo</b>	20	24,40383	0,21150	0,29417	1,24508
<b>CV (%)</b>		11,02	15,20	2,24	30,12

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ), \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 < p < .05$ ), <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ ), pelo teste F. FV= Fonte de variação. GL= Grau de liberdade.

O modelo de regressão linear foi o que melhor se ajustou ao conjunto de dados de N ( $R^2 = 0,73$ ) e  $\delta^{15}\text{N}$  ( $R^2 = 0,81$ ), podendo-se observar redução linear na concentração destas variáveis em função do decréscimo do  $\Psi_w$  (Figura 21). Já para  $\delta^{13}\text{C}$  o modelo matemático que melhor se ajustou ao conjunto de dados foi quadrático ( $R^2 = 0,97$ ) e o valor máximo estimado a partir da equação foi de -23,26 deltas sob  $\Psi_w$  de aproximadamente -1,4 MPa.

Alves et al. (2006) explicam que as plantas do ciclo  $\text{C}_3$  discriminam mais intensamente o  $^{13}\text{C}$  e por isso apresentam variações em sua abundância isotópica de -20 a -34 deltas. Já as plantas de ciclo  $\text{C}_4$  discriminam menos o  $^{13}\text{C}$  e apresentam valores que variam de -9 a -17 deltas. Pela diferença média de 14 deltas entre os mecanismos pode-se identificar o ciclo fotossintético das plantas, baseando-se na análise da variação da abundância isotópica de  $^{13}\text{C}$ .

A média da razão isotópica de  $^{13}\text{C}$  em *V. curassavica* foi de  $\delta^{13}\text{C} = -24$ . Sendo assim, este trabalho identificou o mecanismo fotossintético de *V. curassavica* como uma espécie  $\text{C}_3$ .



**Figura 21.** Porcentagem de nitrogênio total (N, %) e razão isotópica de nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) e carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em folhas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

Martinelli et al. (1998) examinaram a composição isotópica de carbono estável da vegetação de um floresta tropical em Rondônia e verificaram que duas espécies da família Boraginaceae, *Cordia ucayiensis* Johnston e *Cordia* sp. *rucei* Mez., apresentaram composição isotópica de carbono entre -30 e -35 deltas, também sendo classificadas como espécies C<sub>3</sub>.

Em condições ambientais normais, plantas de ciclo C<sub>3</sub> realizam maior difusão e fixação do <sup>12</sup>C em comparação ao <sup>13</sup>C, por ele apresentar a menor massa. Porém, quando plantas C<sub>3</sub> estão sob condições de estresse hídrico, a Rubisco tende a discriminar menos o <sup>13</sup>C, devido ao fechamento estomático e conseqüente redução na concentração interna de CO<sub>2</sub> (FOTELLI et al., 2003). Esta alteração tem sido utilizada como uma ferramenta para seleção de variedades mais adaptadas a regiões secas (PATE, 2001). No entanto, nas condições deste experimento não se observou diferença significativa entre os tratamentos com supressão da irrigação (1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa) para a condutância estomática e a concentração intracelular de CO<sub>2</sub>. Conseqüentemente, as plantas submetidas ao menor Ψ<sub>w</sub> (-2,5 MPa) não diferiram significativamente do controle (-0,3 MPa) em relação a δ<sup>13</sup>C (Figura 21). Este resultado pode ser justificado pelo curto período em que as plantas foram submetidas à supressão da irrigação, máximo de oito dias, e a composição isotópica da folha ser influenciada por efeitos a longo prazo.

Lother et al. (2014) encontraram redução na discriminação de δ<sup>13</sup>C em *Aspalathus linearis* sob estresse hídrico, evidenciando que a seca teve efeito significativo no fechamento estomático destas plantas. Assim como Di Matteo et al. (2014) em árvores de uma floresta da região Mediterrânea da Europa, onde registraram aumento no δ<sup>13</sup>C em decorrência da seca.

Verificou-se que tanto para o nitrogênio total como para a razão isotópica de nitrogênio (δ<sup>15</sup>N), o tratamento com -2,5 MPa diferiu significativamente de -0,3 MPa (controle) apresentando decréscimo deste nutriente (Figura 21). Este resultado indica que sob condições de estresse hídrico as plantas podem alocar o nitrogênio foliar para outros órgãos da planta ou terem sua capacidade de absorção de nitrogênio reduzida. Resultados similares foram observados por Bispo (2011) em *Aechmea aquilega* e Lother et al. (2014) em *Aspalathus linearis*.

Em alguns casos, o estudo da  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas possibilita compreender a dinâmica deste nutriente no sistema solo-planta-atmosfera, pois se uma planta cresce utilizando N do solo e de fertilizantes, e uma delas for artificialmente enriquecida com  $^{15}\text{N}$ , é possível determinar a contribuição de cada fonte para a nutrição da planta (ALVES et al., 2006), além disso, é possível compreender os padrões de uso de nitrogênio entre espécies (EVANS, 2001).

### 7.7. Análises do óleo essencial

Com o auxílio do resumo da análise de variância da regressão para o efeito dos diferentes potenciais hídricos no xilema da folha ( $\Psi_w$ ) em relação à massa foliar seca utilizada na extração do óleo essencial (MFS) e o rendimento médio de óleo essencial (ROE) de *V. curassavica* verificou-se diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F para ROE (Tabela 11).

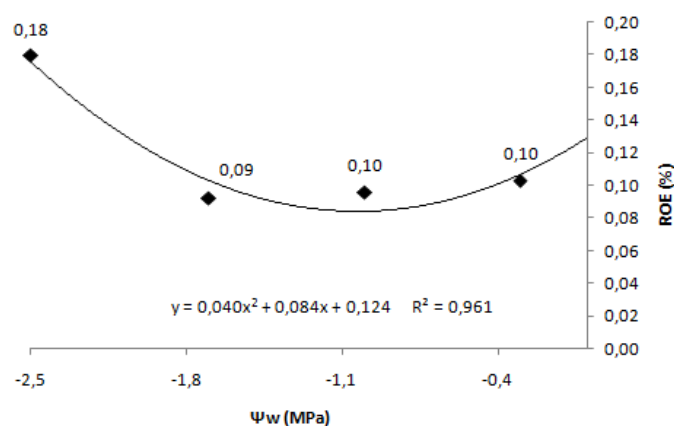
**Tabela 11.** Resumo da análise de variância da regressão para massa foliar seca (g) e rendimento médio de óleo essencial (%) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio	
		Massa foliar seca	Rendimento de óleo essencial
Regressão linear	1	100,59560 <sup>ns</sup>	0,00770*
Regressão quadrática	1	423,04688 <sup>ns</sup>	0,00670*
Regressão cúbica	1	39,64188 <sup>ns</sup>	0,00114 <sup>ns</sup>
Tratamentos	3	187,76145	0,00518
Resíduo	8	116,46095	0,00073
CV (%)		14,02	22,86

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ), <sup>ns</sup> não significativo ( $p \geq .05$ ), pelo teste F. FV= Fonte de variação. GL= Grau de liberdade.

Para esta variável, observa-se que o modelo matemático que melhor se ajustou ao conjunto de dados foi o polinomial de 2º grau (Figura 22), com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,96. O rendimento mínimo de óleo essencial estimado a partir da equação foi de 0,08% sob  $\Psi_w$  de -1,05 MPa.

Sob  $\Psi_w$  -2,5 MPa observou-se que o rendimento de óleo essencial foi de 0,18%, ou seja, 80% superior ao tratamento controle (-0,3 MPa) que foi de 0,10%. Este resultado indica que o *V. curassavica* tende a aumentar a rendimento de óleos essenciais quando submetida à supressão hídrica.



**Figura 22.** Rendimento de óleo essencial de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

Resultados similares foram encontrados por Pinto et al. (2014) ao avaliarem o efeito do estresse hídrico em capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e observarem que o estresse hídrico acentuado (50% da exigência hídrica e intervalo de irrigações de sete dias) proporcionou a maior produção do óleo essencial (0,279 t ha<sup>-1</sup>). Vazin (2013) também encontrou aumento no rendimento de óleo essencial de cominho (*Cuminum cyminum* L.) submetido à deficiência hídrica moderada (2,78%) e severa (2,43%). Já Khalid (2006) verificou incremento no rendimento de óleo essencial de manjeriço (*Ocimum* sp.) no tratamento com estresse leve (50% de seca).

Resultados contrários foram observados por Marques et al. (2009) ao avaliar a influência de diferentes lâminas de irrigação sob a produção de óleo essencial de

orégano (*Origanum vulgare* L.) e verificarem que o rendimento apresentou resposta linear positiva, sendo o maior valor ( $0,32 \text{ g planta}^{-1}$ ) obtido para o tratamento 100% hidratado e o menor ( $0,096 \text{ g planta}^{-1}$ ) para o tratamento sem irrigação. Já Baghalian et al. (2011) não encontraram diferença significativa no rendimento e na composição química de camomila (*Matricaria recutita* L.) submetida a quatro níveis de deficiência hídrica.

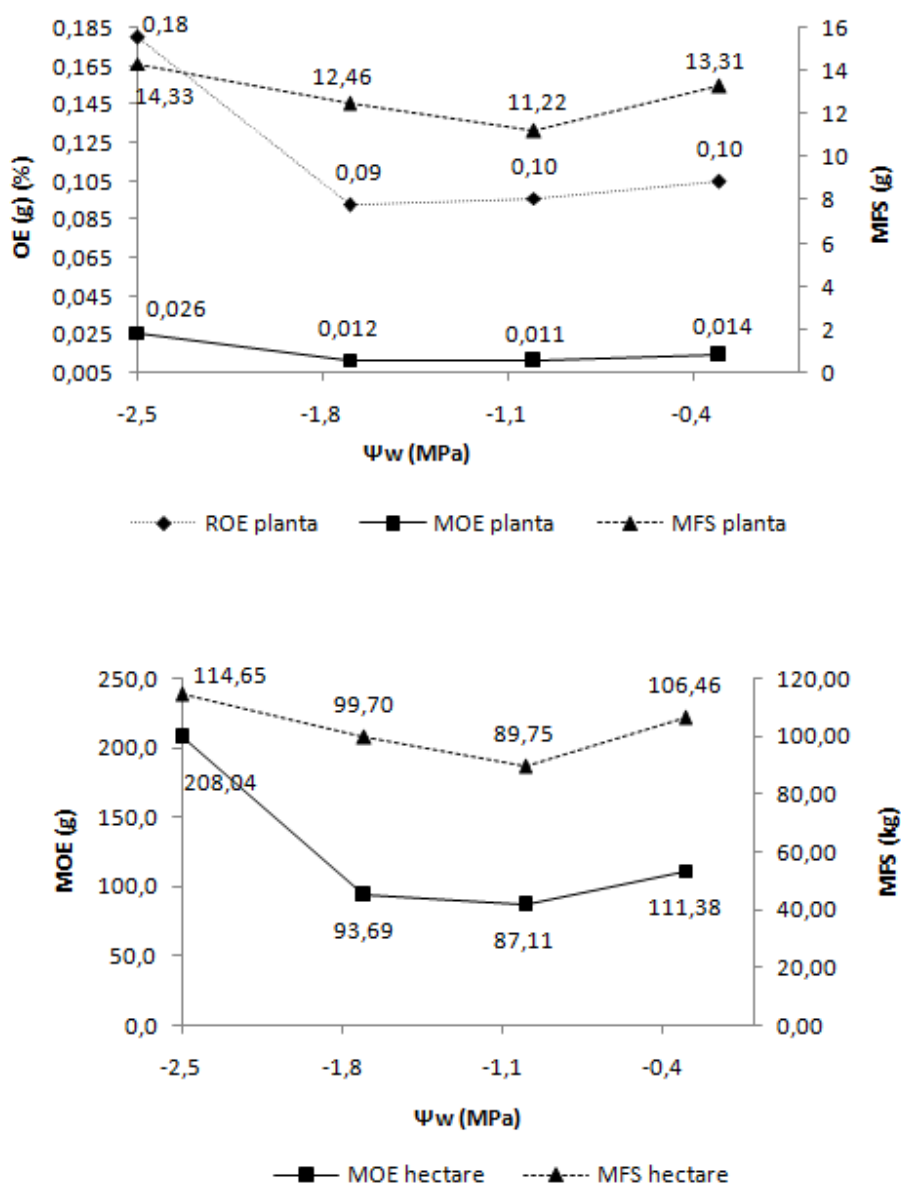
Souza et al. (2011) avaliaram a influência do horário de colheita na produção de óleo essencial de *V. curassavica* e verificaram que os teores de óleo essencial foram de 0,65%, 0,90%, 0,82%, 0,47% e 0,96%, nos horários 6h, 9h, 12h, 15h e 18h, respectivamente, sendo o horário de 18h o de maior produtividade.

Ao comparar a produção de óleo essencial de erva baleeira em duas diferentes localidades, Gomes (2010) encontrou variação significativa entre as mesmas. A média do teor de óleo em Italva foi de 1,38%, enquanto que a média de Campos dos Goytacazes foi de 0,78%. Além disso, Feijó et al. (2014) avaliaram o efeito da luminosidade no rendimento de óleo essencial da mesma espécie e observaram comportamento linear crescente, com maior produção de óleo essencial (0,6%) nas plantas expostas a maior irradiância (100%).

Montanari Jr. (2011) realizou experimento de campo e comparou o rendimento e a massa de óleo essencial de *V. curassavica* em três diferentes colheitas, obtendo os melhores resultados na última colheita, 0,60% e 1,15 gramas, respectivamente.

Ao analisar a produtividade de óleo essencial e de massa seca de *V. curassavica* por planta (Figura 23) observou-se o mesmo comportamento apresentado na Figura 22, pois o menor  $\Psi_w$  (-2,5 MPa) diferiu significativamente dos demais tratamentos e apresentou os maiores resultados para rendimento de óleo essencial (ROE) (0,18%) e massa de óleo essencial (MOE) (0,026 g), sem provocar mudanças significativas na produção de fitomassa (MSF).

Além disso, pode se verificar na produção por hectare que as plantas apresentaram a maior massa de óleo essencial (208,04 g) sob -2,5 MPa, evidenciando tendência de aumento da MOE em plantas submetidas ao menor potencial hídrico, sem alterar a produção de fitomassa.



**Figura 23.** Rendimento de óleo essencial por planta (ROE, %), massa do óleo essencial por planta e hectare (MOE, g) e massa foliar seca por planta e hectare (MFS, g e kg) de plantas de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

Este resultado é diferente do esperado quando se submete a maioria das espécies a condições de estresse de hídrico. Marchese (1999) destaca que geralmente ocorre uma redução da fitomassa em face da concorrência por assimilados entre o metabolismo especializado e o metabolismo primário, ressaltando que um aumento na



concentração ou teor de compostos secundários sob condição de estresse, não significa necessariamente um aumento no rendimento destes compostos (produção por planta ou por área cultivada).

Na extrapolação dos dados para hectares considerou-se que as plantas responderiam em campo, sob densidade de 8000 plantas hectare<sup>-1</sup>, conforme utilizado por Montanari Jr. (2011), da mesma forma que responderam em vasos. É sabido que em condições de campo as plantas estão expostas a diferentes condições ambientais e suas respostas metabólicas são variáveis, no entanto, foi necessária esta extrapolação para se ter uma estimativa de produtividade da espécie sob estresse hídrico, a fim de se fornecer subsídio para futuros trabalhos de campo com *V. curassavica*.

Sendo assim e nas condições deste experimento, a supressão da irrigação foi eficiente no aumento da produtividade do óleo essencial de *V. curassavica*.

Foram identificadas 25 substâncias no óleo essencial de *V. curassavica*, comuns a todos os tratamentos (Tabela 12), destas o  $\alpha$ -pineno, (*E*)-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno correspondem às substâncias majoritárias. Dentre as substâncias identificadas não se observou diferença significativa na proporção relativa em função dos diferentes potenciais hídricos no xilema da folha ( $\Psi_w$ ), exceto para o  $\gamma$ -(*E*)-bisaboleno, em que -1,0 MPa e -1,7 MPa diferiram entre si, indicando que a supressão hídrica não teve influência sobre a síntese das substâncias presentes no óleo essencial de *V. curassavica*.

Pode-se verificar que as maiores proporções relativas de hidrocarbonetos monoterpênicos nos óleos essenciais foram sob potenciais hídricos de -1,7 MPa e -2,5 MPa. Para os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e aldeídos as maiores proporções relativas foram observadas sob potencial hídrico de -1 MPa, com destaque para as substâncias de maior interesse na indústria farmacêutica presentes no óleo essencial de *V. curassavica*, (*E*)-cariofileno (25,2%) e  $\alpha$ -humuleno (4,4%), os quais, não diferiram estatisticamente em relação à proporção relativa em função dos tratamentos (Tabela 12).

**Tabela 12.** Composição química média dos óleos essenciais (%) de *Varronia curassavica* submetidas à supressão da irrigação, em função dos potenciais hídricos no xilema da folha de -0,3 MPa, -1,0 MPa, -1,7 MPa e -2,5 MPa. Campinas, São Paulo, 2014.

Substâncias	Tratamentos			
	-0,3 MPa	-1,0 MPa	-1,7 MPa	-2,5 MPa
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>	<b>39,3a</b>	<b>37,0a</b>	<b>49,4a</b>	<b>48,8a</b>
α-pineno	35,9a	33,9a	45,2a	44,9a
Sabineno	0,5a	0,4a	0,6a	0,6a
β-pineno	1,7a	1,5a	2,1a	1,9a
Mirceno	0,4a	0,4a	0,5a	0,5a
β-felandreno	0,9a	0,8a	1,0a	1,0a
<b>Monoterpenos Oxigenados</b>	<b>2,0a</b>	<b>1,9a</b>	<b>2,2a</b>	<b>2,0a</b>
1,8-cineol	0,6a	0,5a	0,7a	0,7a
acetato de bornila	1,0a	1,0a	1,0a	0,9a
acetato de citronelila	0,4a	0,4a	0,4a	0,4a
<b>Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos</b>	<b>38,9a</b>	<b>39,6a</b>	<b>32,8a</b>	<b>32,0a</b>
Sesquijujeno	1,7a	1,8a	1,5a	1,5a
α-(Z)-bergamoteno	1,4a	1,5a	1,2a	1,2a
(E)-cariofileno	24,8a	25,2a	21,1a	20,4a
α-(E)-bergamoteno	0,2a	0,3a	0,2a	0,2a
β-(Z)-farneseno	0,3a	0,3a	0,3a	0,3a
α-humuleno	4,3a	4,4a	3,7a	3,7a
β-(E)-farneseno	0,7a	0,8a	0,6a	0,6a
β-santaleno	0,2a	tr	0,2a	tr
γ-muroleno	0,2a	0,3a	0,2a	0,2a
β-bisaboleno	2,7a	2,8a	2,2a	2,3a
δ-amorfeno	0,4a	0,4a	0,4a	0,4a
β-sesquifelandreno	0,8	0,8a	0,6a	0,6a
γ-(E)-bisaboleno	1,1ab	1,1a	0,8b	0,9ab
<b>Sesquiterpenos Oxigenados</b>	<b>1,4a</b>	<b>1,6a</b>	<b>1,1a</b>	<b>1,2a</b>
α-(Z)-santalol	0,8a	0,8a	0,6a	0,6a
β-(Z)-santalol	0,4a	0,4a	0,3a	0,3a
acetato de α-(Z)-santalol	0,3a	0,3a	0,2a	0,2a
<b>Aldeídos</b>	<b>0,4a</b>	<b>0,5a</b>	<b>0,4a</b>	<b>0,5a</b>
n-nonanal	0,4a	0,5a	0,4a	0,5a
<b>Total identificado</b>	<b>81,83</b>	<b>80,57</b>	<b>85,55</b>	<b>84,66</b>

tr= traço (tr≤ 0,04).

\*Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤ 0,05).

Herms e Mattson (1992) realizaram um trabalho de revisão relatando o dilema das plantas entre crescer ou se defender, e com base em diversos autores eles inferiram que quando as condições ambientais são favoráveis, o crescimento vegetativo recebe geralmente prioridade de recursos sobre o metabolismo especializado. No entanto, pode ocorrer variação quantitativa nos compostos do metabolismo especializado das plantas em função da variação do ambiente externo. Além disso, destacam que defesa não é a única função dos metabólitos especializados em plantas, pois eles também atuam na atração de polinizadores, na proteção contra os raios ultravioleta, como apoio estrutural, facilitação da absorção e armazenamento temporário de nutrientes, regulação fitohormonal, resistência à seca, proteção de raízes contra ambientes ácidos e mediando relações simbióticas de plantas com bactérias fixadoras de nitrogênio.

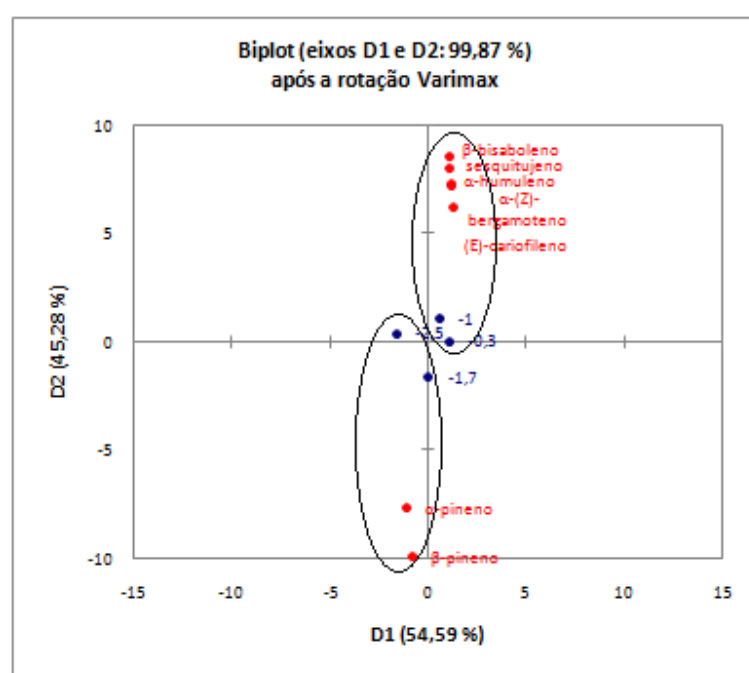
Cai et al. (2002) avaliaram a expressão do gene  $\beta$ -cariofileno síntase em *Artemisia annua* e verificaram que este gene é expresso na maioria dos tecidos vegetais durante o desenvolvimento inicial, mas que pode ser induzido em tecidos maduros em resposta a um eliciador fúngico. Além disso, Kollner et al. (2008) identificaram em milho uma terpeno síntase (TPS23) envolvida na biossíntese de (*E*)- $\beta$ -cariofileno e observaram que a diminuição da transcrição desse gene na maioria das linhagens norte-americanas reduziu sua resistência contra a herbivoria. Estes resultados evidenciam que a função do sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno está envolvida na defesa das plantas, tendo sua biossíntese aumentada sob condições de estresse biótico.

Nowak et al. (2010) observaram aumento de monoterpenos de cerca de 33% em folhas de sálvia (*Salvia officinalis* L.) submetidas a estresse hídrico moderado (70% da necessidade hídrica).

Gershenzon et al. (2000) destacam que os monoterpenos, terpenos com 10 carbonos ( $C_{10}$ ), são a maior classe de compostos de defesa em plantas e os mais estudados, devido sua importância econômica para a indústrias de aromas, fragrâncias e farmacêuticas. Estes autores mediram o acúmulo e as taxas de síntese de monoterpenos nas folhas de hortelã-pimenta em desenvolvimento e verificaram que o perfil ontogenético de acúmulo de monoterpenos na espécie pode ser influenciado tanto pela síntese quanto pela perda de monoterpenos, sendo que, o pico da biossíntese de monoterpenos coincide com o momento em que as células secretoras do tricomas glandulares estão metabolicamente ativas.

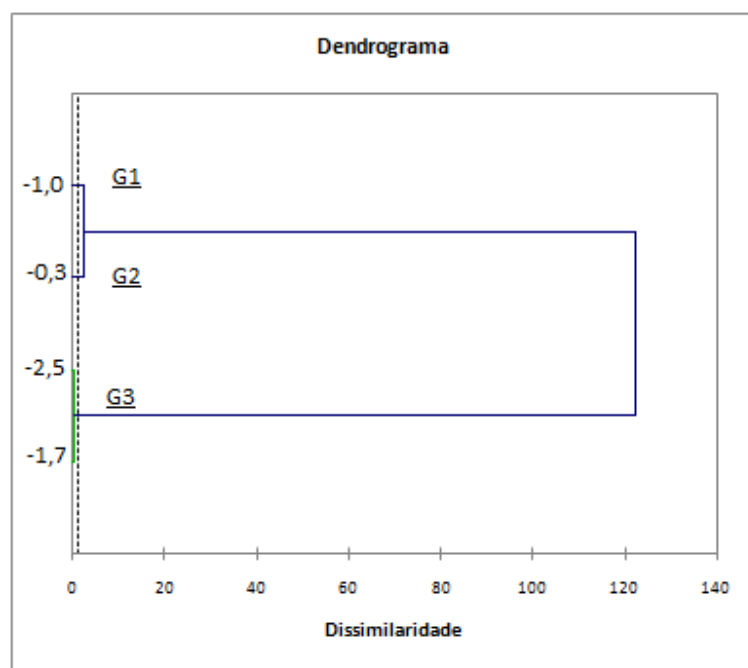
Observando-se os  $\Psi_w$ , a ACP exprimiu 99,87% da variação total nos primeiros componentes principais (eixos), sendo 54,59% para o primeiro eixo (D1) e 45,28% para o segundo eixo (D2) (Figura 24).

No eixo D1, os tratamentos -0,3 MPa (controle) e -1,0 MPa estão mais correlacionados com o acúmulo de  $\beta$ -bisaboleno, sesquitujeno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -(Z)-bergamoteno e (E)-cariofileno. No eixo D2, os  $\Psi_w$  -1,7 MPa e -2,5 MPa se correlacionaram com o acúmulo de  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno.



**Figura 24.** Padrão de divergência química entre os  $\Psi_w$ , definido pela Análise de Componentes Principais com base nas sete substâncias com maior proporção relativa média no óleo essencial de *Varronia curassavica*. Campinas, São Paulo, Brasil.

A dissimilaridade química entre os tratamentos pode ser observada na Figura 25, evidenciando-se a formação de três grupos, onde os  $\Psi_w$  se correlacionaram com as sete substâncias apresentadas na Figura 24. O grupo 1 (G1) formado pelo tratamento -1,0 MPa, o grupo 2 (G2) formado por -0,3 MPa e o grupo 3 (G3) formado -2,5 MPa e -1,7 MPa. Estes resultados são similares aos encontrados na ACP.



**Figura 25.** Dendrograma resultante da análise de agrupamento para os quatro tratamentos avaliados, a partir da proporção relativa média das sete substâncias mais abundantes no óleo essencial de *Varronia curassavica*, utilizando a Distância Euclidiana e a análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica.

## 8. CONCLUSÃO

A supressão da irrigação provocou alterações no desenvolvimento de *V. curassavica*.

O conteúdo relativo de água das folhas de *V. curassavica* reduziu em função da supressão da irrigação.

As variáveis de trocas gasosas não foram afetadas pelos diferentes níveis de supressão de irrigação.

A espécie *V. curassavica* apresenta mecanismo fotossintético do tipo  $C_3$ .

A supressão da irrigação foi eficiente no aumento do rendimento de óleo essencial de *V. curassavica*, sem provocar perdas no acúmulo de fitomassa.

As proporções relativas dos constituintes químicos do óleo essencial de *V. curassavica*, dentre eles, os princípios ativos (*E*)-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno, não foram alteradas pela supressão hídrica.

Dentre os mecanismos bioquímicos envolvidos na defesa *V. curassavica* à supressão da irrigação, o limite de atividade da enzima superóxido dismutase e o maior acúmulo de prolina foram sob -1,7 MPa.

## 9. REFERÊNCIAS

ACHEFLAN será lançado no México. São Paulo: Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., 2015. Disponível em: <<http://www.ache.com.br/PressRoom/News.aspx?NewsId=488>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995.

AKISUE, M. K. et al. Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura de *Cordia verbenacea* AL. DC.- Boraginaceae. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, SP, v. 5, p. 69-82, 1983.

ALVARENGA, I. C. A. et al. Prolina livre em alecrim-pimenta sob estresse hídrico antes da colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 13, n. especial, p. 539-541, 2011.

ALVES, B. J. R. et al. Emprego de Isótopos Estáveis para o Estudo do Carbono e do Nitrogênio no Sistema Solo-Planta. **Biota**, Brasília, Capítulo 13, p. 343-368, 2006. Disponível em: <[www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap13ID-ClaXOEabVo.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap13ID-ClaXOEabVo.pdf)>. Acesso em: 05 fev. 2015.

AZHAR, N. et al. Water stress mediated changes in growth, physiology and secondary metabolites of desi ajwain (*Trachyspermum ammi* L.). **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 43, p. 15-19, 2011.

- BAGHALIAN, K. et al. Physiological and phytochemical response to drought stress of German chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, p. 201-207, 2011.
- BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. **Australian Journal of Biological Science**, Melbourne, v. 15, p. 413-428, 1962.
- BATES, L. S.; WALDERN, R. P.; TEARE, I. D.; Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, The Hague, v. 39. p. 205-207, 1973.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41 p.
- BETTAIEB, I. et al. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, p. 271-275. 2009.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1. ed. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160p.
- BISPO, S. M. **Variação na composição isotópica de carbono e nitrogênio da matéria orgânica e biomassa da coroa foliar de *Aechmea aquilega* (Salisb.) griseb bromeliaceae em caatinga, agreste e mata atlântica de Sergipe**. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BOYER, J. S. **Measuring the water status of plant and soils**. London: Academic Press, 1995.178 p.
- BRADFORD, M. M. A dye binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.



BRANDÃO, V. et al. **Brasil Inovador: o desafio empreendedor: 40 histórias de sucesso de empresas que investem em inovação**. Brasília: IEL-NC. 2006. 164 p.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 103, p.1035-1040. 1993.

BROETTO, F.; LÜTTGE, U.; RATAJCZAK, R. Influence of light intensity and salt-treatment on mode of photosynthesis and enzymes of the antioxidative response system of *Mesembryanthemum crystallinum*. **Functional Plant Biology**, Western, v. 29, p. 13-23, 2002.

CAI, Y. et al. A cDNA clone for  $\beta$ -caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, New York, v. 61, p. 523–529, 2002.

CARVALHO JR, P. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 95, p. 297–301. 2004.

CASTRO, G. L. S. et al. Peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes em folíolos de Andirobeira submetidos ao déficit hídrico in vivo e in vitro. In: 9º Seminário Anual de Iniciação Científica, 2011, Belém. **Anais...** 19 a 21 de outubro de 2011.

CAVERZAN, A. **Caracterização funcional dos genes de ascorbato peroxidase de arroz (*Oryza sativa* L.) nas interações entre estresse oxidativo e estresses abióticos**. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CIARMIELLO L. F. et al. In: *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. **Chapter 13: Plant Genes for abiotic stress**, Rijeka: InTech, 2011, 440 p.

COCA, M. A.; ALMOGUERA, C.; JORDANO, J. Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 25, p. 479-492, 1994.

COSCOLIN, R. B. S. **Efeitos fisiológicos e bioquímicos induzidos por deficiência hídrica em plantas de *Ocimum basilicum* L.** 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia/Irrigação e Drenagem)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2012.

CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C.; MING, L. C. **Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2006. 76 p.

CUNHUA, S. et al. Effects on physiological and biochemical characteristics of medicinal plant pigweed by drought stresses. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 5, n. 17, p. 4041-4048, 2011.

DEL LONGO, O. T. et al. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 34, p. 1023-1028, 1993.

DI MATTEO, G. Changes in foliar carbon isotope composition and seasonal stomatal conductance reveal adaptive traits in Mediterranean coppices affected by drought. **Journal of Forestry Research**, Beijing, v. 25, n. 4, p. 839-845, 2014.

DOMINGOS, V. D. et al. Efeito do cobre na atividade da enzima pirogalol peroxidase em plantas de *Myriophyllum aquaticum* cultivadas em solução nutritiva. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 2, p. 375-380, 2005.

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

EGERT, M.; TEVINI, M. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). **Environmental and Experimental Botany**, New York, v. 48, p. 43–49, 2002.

EMERSON ECOLOGICS: Delivering to improve health. Cordia extreme™ 2 OZ (Cordia). 2015. Disponível em: < <https://www.emersonecologics.com/Products/EmersonMain/PID-CORDIA.aspx>> . Acesso em: 21 mar. 2015.

EVANS, R. D. Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. **Plant Science**, Limerick, v. 6, n. 3, 2001.

FEIJÓ, E. V. R. S. et al. Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. **Revista Brasileira Farmacognosia**, Curitiba, v. 24, p. 516-523, 2014.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FOTELLI, M. N. et al. Carbon isotope composition of various tissues of beech (*Fagus sylvatica*) regeneration is indicative of recent environmental conditions within the forest understory. **New Phytologist**, Cambridge, v. 159, p. 229–244. 2003.

FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; BALDERAS-HERNÁNDEZ, V. E. In: Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture. **Chapter 2: Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses**, Rijeka: InTech, 2013.

FUMIS, T. F.; PEDRAS, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 449-453, 2002.

GENEVE, R. L. et al. Capillary Mats Alter the Water Content in medium during Mist Propagation of *Dendranthema*. **American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 39, n. 3, 2004.

GERSHENZON J., McConkey M. E., Croteau R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, p. 205–213, 2000.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superóxido dismutases: I. occurrence in Higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, p. 309-314, 1977.

GOMES, P. A. **Óleo essencial da erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.) de áreas nativas**. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2010.

HERMS, D. A.; MATTSON, W. J. The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. **The Quarterly Review of Biology**, v. 67, n. 3, p. 283-335, 1992.

HERBORISTERIE BARDOU. Sage black (*Cordia verbenacea* DC.) Sheet. 2015.  
Disponível em: <<http://www.herboristeriebardou.com.fr/HE397>>. Acesso em 15 mar. 2015.

ISO 9235:2013. Disponível em < <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:en>>.  
Acesso em 26 jun. 2015.

JALEEL, C. A. et al. Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 61, p. 298–303, 2008.

JONES, H. G. **Plant and Microclimate**. 2. ed. Cambridge: University Press. 1992. 428 p.

KANNAN, N. D.; KULANDAIVELU, G. Drought induced changes in physiological, biochemical and phytochemical properties of *Withania somnifera* Dun. **Journal of Medicinal Plants Research**, Ebène, v. 5, n. 16, p. 3929-3935, 2011.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.57, p. 315-319, 1976.

KHALID, K. A. Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). **International Agrophysics**, Lublin, v. 20, p. 289-296, 2006.

KHALID, K. A.; SILVA, J. A. T.; CAI, W. Water deficit and polyethylene glycol 6000 affects morphological and biochemical characters of *Pelargonium odoratissimum* (L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 125, p. 159–166, 2010.

KÖPPEN, W. **Climatologia**: con um estudo de los climas de la Tierra. México: Fondo de Cultura Economica, 1948. 478 p.

KOLLNER, T. G. et al. A maize (E)-β-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, p. 482–494, 2008.

KUMAR, A.; SINGH, D. P. Use of physiological indices as a screening technique for drought to tolerance in oilseed *Brassica* species. **Annals of Botany**, London, v. 81, p. 413-420, 1998.

LAMBERS, H., Chapin, F. S., Pons, T. L. **Plant Physiological Ecology**. New York: Springer-Verlag, 1998. 540p.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. In vitro propagation of *Cordia verbenacea* L. (Boraginaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n. esp., p.102-104, 2006.

LAWLOR D. W. **Photosynthesis**, 3. ed. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2001. 398 p.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas e tóxicas**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008. 639 p.

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

LOTTER, D. et al. Physiological responses of a fynbos legume, *Aspalathus linearis* to drought stress. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 94, p. 218–223, 2014.

MAHAJAN, S.;TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 444, p. 139–158, 2005.

MARCHESE, J. A. **Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresses abióticos**. 1999. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

MARCHESE, J. A. et al. Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] plants. **Photosynthetica**, Olomouc, v. 46, n. 4, p. 501-505, 2008.

MARCHESE, J. A. et al. Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*Artemisia annua* L., Asteraceae). **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 22, n. 1, p.1-9, 2010.

MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, G. M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.7, n.3, p.86-96, 2005.

MARQUES, M. O. M. et al. Essential Oils: History, Biosynthesis, and Agronomic Aspects. In: **Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects**. New York: Nova Science Publishers, 2012, v. 1, p. 3-22.

MARQUES, M. O. M. et al. Capítulo 4: Óleos essenciais. In: HABER, L. L.; CLEMENTE, F. M. V. T. **Plantas aromáticas e condimentares: uso aplicado na horticultura**. Brasília: Embrapa, 2013. 152 p.

MARQUES, P. A. A. et al. Crescimento, produção de óleo essencial e trocas gasosas em orégano influenciados por diferentes lâminas de irrigação. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1888-1892, 2009.

MARTINELLI, L. A. et al. Stable carbon isotope ratio of tree leaves, boles and fine litter in a tropical forest in Rondônia, Brazil. **Oecologia**, Berlin, v. 114, p. 170–179, 1998.

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**. London, v. 151, p. 618–627, 2007.

MELO, H. C. et al. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 145-153, 2007.

METWALLY, S.; KHALID K. A.; ABOU-LEILA, B. H. Effect of water regime on the growth, flower yield, essential oil and proline contents of *Calendula officinalis*. **Nusantara Bioscience**, Surakarta, v. 5, n. 2, p. 65-69. 2013.

MICHIELIN, E. M. Z. **Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases**. 2009. 235 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 9. p. 405–410, 2002.

MONTANARI JR., I. Cultivo comercial de erva-baleeira. **Revista Agroecologia Hoje**, Botucatu, v. 3, n.1, p. 14-15, 2000.

MONTANARI JR., I. **Variabilidade genética em uma população de *Cordia verbenacea* DC. para características agronômicas e fitoquímicas**. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

NASROLLAHI, V. et al. The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*). **Phytochemistry**, New York, v. 103, p. 32–37, 2014.

NOWARK, M. et al. Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Berlin, v. 83, p. 133-136, 2010.

OSHADHI. Black sage, *Cordia verbenacea* DC. 2015. Disponível em: <<http://www.oshadhi.co.uk/black-sage-cordia-verbenacea-d-c/>>. Acesso em 15 mar. 2015.

PACHECO, A. C.; CAMARGO, P. R.; SOUZA, G. M. Deficiência hídrica e aplicação de ABA nas trocas gasosas e no acúmulo de flavonoides em calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 275-281, 2011.

PARRON, L. M. et al. **Composição isotópica de carbono e nitrogênio em solos e plantas de uma mata de galeria: efeito do gradiente topográfico**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. 24 p.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 110, p.323–333, 2007.

PATE, J. S. Carbon isotope discrimination and plant water-use efficiency: case scenarios for C3 plants. In: UNKOVICH, M.; PATE, J.; MCNEILL, A.; GIBBS, D. J. **Stable isotope**

**techniques in the study of biological process and functioning of ecosystems.** Dordrecht: Kluwer, 2001. v. 40, p. 19-36.

PEIXOTO, P. H. P. et al. Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.11, n. 3, p.137-143, 1999.

PINTO, D. A. et al. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.16, n.1, p.54-61, 2014.

PIRZAD, A. et al. Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 5, n. 12, p. 2483-2488, 2011.

QUISPE-CONDORI, S. et al. Obtaining  $\beta$ -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 46, p. 27–32, 2008.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.

REIS, M. B. A. **Análise comparativa de proteínas expressadas sob estresse hídrico em palma forrageira (*Opuntia cochenillifera*)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2009.

RENISUS. Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. 2009. Disponível em:  
<[http://fcfrp.usp.br/dcf/download.php?file=arquivos/docentes/6/60.pdf&name\\_file=RENISUS%20-%202009.pdf](http://fcfrp.usp.br/dcf/download.php?file=arquivos/docentes/6/60.pdf&name_file=RENISUS%20-%202009.pdf)>. Acesso em 15 de jan. 2015.

RODRIGUES, F. F. G. et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, Bangalore, v. 4, n. 3, p. 161–165, 2012.



SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SCANDALIOS, G. J. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p. 221–227. 2007.

SHULAEV, V. et al. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, p. 199–208, 2008.

SILVA, A. C. et al. Trocas gasosas e ciclo fotossintético da figueira 'Roxo de Valinhos'. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1270-1276, 2010.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 125, p. 27-58, 1993.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v.1, n. 1, p. 9, 2007.

SOUZA, M. F. et al. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Biotemas**, Florianópolis, v. 24, n. 1, p. 9-14, 2011.

STERNBERG, L. S. L. et al. Compensation Point and Isotopic Characteristics of C3/C4 Intermediates and Hybrids in Panicum. **Plant Physiology**, Rockville, v. 80, p. 242-245. 1986.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. California: The Benjamin/ Cummings, 1991. 559 p.

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

VAN DEN DOOL H.; KRATZ D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, p. 463-467, 1963.

VAZ, A. P. A et al. Biomassa e composição química de genótipos melhorados de espécies medicinais cultivadas em quatro municípios paulistas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 869-872, 2006.

VAZIN, F. Water stress effects on Cumin (*Cuminum cyminum* L.) yield and oil essential components. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 151, p. 135–141, 2013.

VENTRELLA, M. C., MARINHO, C. R. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, p. 457-467, 2008.

WOLFE, D. W. et al. Interactive water and nitrogen effects on senescence of maize: I. Leaf area duration, nitrogen distribution, and yield. **Agronomy Journal**, Madison, v.80, p. 859-864, 1988.

YAKIR, D.; STERNBERG, L. S. L. The use of stable isotopes to study ecosystem gas exchange. **Oecologia**, Berlim, v. 123, p. 297–311, 2000.

ZHANG, S. et al. Temperature-dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO<sub>2</sub> assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday higher irradiance. **Photosynthetica**, Prague, v. 39, p. 383-388, 2001.

## **10. APÊNDICE**

### **DADOS ORIGINAIS**

**APÊNDICE 1.** Dados originais das avaliações das características biométricas e de análises de crescimento.

AL	DC	NF	AF	MFF	MCF	MRF	MTF	VR	MFS	MCS	MRS	MTS	RPF	RAF
1,9667	0,7000	142,6667	3138,9378	57,7300	76,1700	5,6022	139,5022	11,2222	10,1922	24,5633	3,7378	38,4933	0,26478	81,54497
1,9100	0,7944	134,7778	3158,7767	61,0533	83,3800	7,5122	151,9456	13,5000	10,9044	26,8767	4,1844	41,9656	0,25984	75,27070
1,9078	0,6611	144,1111	2972,2756	55,3678	74,9367	8,9833	139,2878	13,5556	9,5033	23,6844	4,0511	37,2389	0,25520	79,81644
1,7522	0,7722	170,1111	3571,8956	68,4511	87,1944	13,9789	169,6244	25,0000	13,1700	28,2822	4,8511	46,3033	0,28443	77,14122
1,9756	0,8444	205,1111	4242,9967	78,8056	108,0300	15,2344	202,0700	26,1111	15,4744	34,9533	5,6456	56,0733	0,27597	75,66871
1,8633	0,8389	170,0000	3739,8144	70,8233	91,2467	8,6889	170,7589	17,7778	13,4378	28,7956	4,6089	46,8422	0,28687	79,83854
1,8067	0,7000	132,3333	3198,6700	51,4833	58,8500	3,3100	113,6433	6,6667	8,4700	16,5933	2,6967	27,7600	0,30512	115,22586
1,9500	0,8333	142,3333	2977,8900	53,1967	74,2567	6,6233	134,0767	12,3333	10,8667	24,7433	4,1533	39,7633	0,27328	74,89035
1,5050	0,7500	151,3333	1937,7900	36,3100	58,3000	13,3050	107,9150	20,5000	12,1000	26,9750	6,3450	45,4200	0,26640	42,66380
1,8167	0,6667	160,6667	2887,4800	52,4367	67,8900	9,2367	129,5633	15,6667	8,2300	23,2800	4,1100	35,6200	0,23105	81,06345
1,6533	0,5667	154,7333	1984,2433	40,6767	48,1733	3,5567	92,4067	8,6667	6,9533	13,6300	2,4600	23,0433	0,30175	86,10921
1,7667	0,8000	187,0000	3456,9833	56,2800	79,2200	8,2700	143,7700	13,0000	11,1500	26,1233	4,7000	41,9733	0,26564	82,36142
1,7200	0,6667	164,6667	2106,1667	32,2933	57,1567	6,7800	96,2300	13,6667	11,4767	24,7167	2,9733	39,1667	0,29302	53,77447
1,7667	0,7333	116,6667	2454,5100	45,5167	60,3233	4,7433	110,5833	7,6667	9,2500	20,3300	2,9400	32,5200	0,28444	75,47694
1,6467	0,6667	151,3333	2368,1433	39,4067	59,9300	7,0600	106,3967	24,0000	10,7133	22,8333	4,2267	37,7733	0,28362	62,69352
1,9633	0,8167	224,6667	2762,9300	36,1700	80,0867	19,2100	135,4667	26,6667	17,8600	39,3933	7,6033	64,8567	0,27538	42,60056
1,7733	0,8333	198,3333	2419,5900	34,7467	78,7500	14,2867	127,7833	20,0000	14,6533	35,0433	7,4567	57,1533	0,25639	42,33506
1,5667	0,6500	132,6667	2202,0200	41,9300	57,9633	10,0733	109,9667	8,0000	9,1833	20,4367	3,6733	33,2933	0,27583	66,13997
1,6000	0,7667	194,0000	1166,2000	18,6867	62,4033	10,6300	91,7200	17,0000	15,1867	39,2600	8,2900	62,7367	0,24207	18,58881
1,7500	0,7333	184,3333	1573,8833	20,2033	63,3033	11,0600	94,5667	26,6667	15,5000	39,1400	7,2200	61,8600	0,25057	25,44267
1,5600	0,7667	159,3333	997,9300	16,8633	53,5300	12,4167	82,8100	23,6667	12,9267	32,6933	6,1400	51,7600	0,24974	19,27995
1,6600	0,5667	128,6667	1502,6500	28,3067	46,6200	8,1667	83,0933	17,0000	9,9700	20,2833	3,5733	33,8267	0,29474	44,42205
1,6300	0,9000	146,3333	2652,1100	19,8067	61,2767	17,4067	98,4900	29,6667	16,4467	36,6500	7,4533	60,5500	0,27162	43,80033
1,5333	0,7667	162,0000	959,0200	18,5200	53,5167	9,8400	81,8767	19,0000	13,3600	29,9967	6,1933	49,5500	0,26963	19,35459

AL= altura ( m); DC= diâmetro de caule (cm); NF= número de folhas (un); AF= área foliar (cm<sup>2</sup>); MFF= massa das folhas frescas (g); MCF= massa de caules frescos (g); MRF= massa de raízes frescas (g); MTF= massa total fresca (g); VR= volume de raiz (cm<sup>3</sup>) MFS= massa de folhas secas (g); MCS= massa de caules secos (g); MRS= massa de raízes secas (g); MTS= massa total seca (g); RMF= razão de massa foliar (g cm<sup>-2</sup>); RAF= razão de área foliar (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>).

**APÊNDICE 2.** Dados originais das avaliações das características fisiológicas e teor relativo de clorofila (SPAD).

<i>A</i>	<i>G<sub>s</sub></i>	<i>C<sub>i</sub></i>	<i>E</i>	EUA	EiC	SPAD
14,33745	0,18899	204,4218	3,417056	4,19585	0,070137	40,9111
12,63777	0,14999	218,1824	2,901611	4,35543	0,057923	42,9822
11,76262	0,11754	204,5068	2,617885	4,49318	0,057517	41,0800
13,39906	0,12591	174,2861	2,555499	5,24323	0,076880	40,3600
13,87224	0,16036	225,8134	3,56413	3,89218	0,061432	38,7044
15,12803	0,16867	215,5347	3,567918	4,24002	0,070188	43,8111
4,918821	0,06578	250,4218	1,533923	3,20669	0,019642	43,0667
7,343136	0,07167	203,4018	1,812827	4,05065	0,036102	44,5667
6,936108	0,06903	213,134	1,757622	3,94630	0,032543	42,4667
5,565496	0,05395	205,8687	1,474755	3,77384	0,027034	47,6333
7,552694	0,07611	206,5927	1,929126	3,91509	0,036558	45,5000
7,308063	0,06900	197,8608	1,809882	4,03787	0,036935	42,8800
4,568756	0,03504	164,4682	0,951588	4,80119	0,027779	41,1467
9,097442	0,05612	111,2261	1,165258	7,80723	0,081792	44,1667
7,170434	0,04771	111,934	1,064709	6,73464	0,064060	43,5067
6,889277	0,04527	131,404	0,973965	7,07343	0,052428	40,0733
2,963967	0,06250	295,8229	1,183408	2,50460	0,010019	41,5933
7,570849	0,05100	132,0188	1,129272	6,70419	0,057347	42,1000
10,03674	0,06938	139,2382	1,123142	8,93630	0,072083	39,8733
3,026966	0,03017	212,4606	0,748304	4,04510	0,014247	41,6133
6,08693	0,04868	167,5924	1,31761	4,61968	0,036320	48,8207
9,653099	0,14288	256,9046	3,321676	2,90609	0,037575	38,4200
10,08065	0,08510	177,6654	1,866471	5,40091	0,056739	47,6267
6,947897	0,06259	186,6228	1,650939	4,20845	0,037230	41,4200

*A*= taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); *g<sub>s</sub>*= condutância estomática (mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); *C<sub>i</sub>*= concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>); *E*= taxa de transpiração (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); EUA= eficiência no uso de água (mmol mol<sup>-1</sup>); EiC= eficiência instantânea da carboxilação (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); SPAD= teor relativo de clorofila.

**APÊNDICE 3.** Dados originais das avaliações do conteúdo relativo de água (CRA).

MF	MT	MS	CRA
0,01773	0,02143	0,00388	78,91738
0,0194	0,0229	0,0043	81,20625
0,02034	0,02218	0,00443	89,6338
0,01231	0,02015	0,00319	53,77358
0,01667	0,01842	0,00279	88,80358
0,01683	0,0192	0,00343	84,97146
0,01912	0,0316	0,00395	54,86438
0,00681	0,01636	0,00415	21,78542
0,01308	0,02564	0,00464	40,19048
0,0063	0,01319	0,00362	28,00418
0,0064	0,02198	0,00463	10,20173
0,00577	0,01395	0,00453	13,16348

MF= massa fresca (g); MT= massa túrgida (g); MS= massa seca (g); CRA= conteúdo relativo de água (%).

**APÊNDICE 4.** Dados originais das avaliações das características bioquímicas.

PT	AT	PR	PL	SOD	POX
0,1465394	0,4246	52,7936	6,3783	204,5713	12,47117
0,2082577	0,6476	65,1360	7,0861	125,4515	7,63742
0,2435543	0,6828	64,9638	4,5105	122,0328	6,63288
0,2705307	0,4179	41,6632	8,7162	88,5345	6,47252
0,2465303	0,5500	50,0253	7,6751	95,0762	4,83253
0,1904121	0,5684	46,9846	8,4036	81,2285	5,62357
0,1438727	0,9672	55,3754	4,5338	128,3066	4,18898
0,1707531	0,9589	83,3232	4,5958	96,0628	9,22888
0,2562905	0,9599	100,4275	7,1998	84,7677	2,15880
0,2785309	0,5682	57,8711	5,4328	74,8342	5,98292
0,2447703	0,6026	75,5778	3,0613	70,2115	4,47035
0,0903998	0,4550	40,6592	14,2058	177,6286	3,93452
0,1959055	1,1269	44,9407	2,0383	84,8693	1,95426
0,2385302	0,2638	55,3323	20,3515	160,5046	7,31069
0,3494760	0,1067	335,0903	44,1130	67,3985	14,08597
0,2707547	0,1030	106,4302	11,0670	96,8415	10,86811
0,1450887	0,3016	45,4570	12,1675	237,2387	11,53664
0,1847374	0,1873	136,9791	18,3210	163,9280	14,23049
0,2143058	0,2024	130,7420	15,2443	119,0426	12,97012
0,2776028	0,2872	89,7777	10,0130	68,8407	2,65149
0,4533817	0,0948	441,3952	11,1368	24,3051	2,25545
0,5249028	0,0622	138,7240	18,2048	24,0673	9,31088
0,4991424	0,0528	104,8166	33,5498	40,8425	15,43763
0,434789357	0,1839	214,7576	21,0800	33,7844	1,42591

PT= proteínas solúveis totais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  alíquota); AT= açúcares totais ( $\text{mg AT g}^{-1}$  MF); PR= prolina ( $\text{nmol g}^{-1}$  MF); PL= peroxidação de lipídeos ( $\text{mol de MDA g}^{-1}$  MF); SOD= superóxido dismutase ( $\text{U SOD } \mu\text{g Prot.}^{-1}$ ); POX= peroxidase ( $\mu\text{Kat mg Prot}^{-1}$ ).

**APÊNDICE 5.** Dados originais das avaliações de isótopos estáveis.

C	N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
45,9	3	-25,6	4,7
46	3,3	-24,7	4,8
47,5	3,1	-25,3	3,7
46,6	3,3	-23,7	4,1
43,9	3,4	-25,1	5,7
45,4	3,4	-25,1	4,5
50	3,2	-23,4	4,3
50,1	3,4	-24,3	3,9
45,1	3,2	-23,5	4,9
38,9	4,9	-23,6	0,8
48,5	3,2	-23,6	5,3
49,4	3,1	-23,6	4,8
37,1	3,1	-23,3	0,6
27	1,8	-22,6	3,8
51,7	3,2	-24,2	2,8
46,6	3,4	-22,7	4,5
45,2	3	-24,1	3,5
44,3	2,6	-22,7	3
44	2,4	-24,9	3,2
43,8	2,5	-25,2	3,4
43,5	2,5	-25,3	3,4
44,9	2,5	-25,5	3
44,5	2,6	-25	3
46,3	2,5	-24,6	3,2

C= carbono total (%); N= nitrogênio total (%);  $\delta^{13}\text{C}$ = razão isotópica de carbono ( $\Delta$ );  $\delta^{15}\text{N}$ = razão isotópica de nitrogênio ( $\Delta$ ).



**APÊNDICE 6.** Dados originais das avaliações de massa foliar seca (MFS), massa de óleo essencial (MO) e rendimento de óleo essencial (ROE).

MFS	MOE	ROE
70,92333	0,0746	0,099927
88,79	0,084167	0,093706
79,82667	0,091833	0,115742
64,12	0,084	0,1310
75,33	0,0817	0,1085
62,48	0,0303	0,0485
63,88	0,0615	0,096274
87,99	0,1025	0,116491
72,46	0,0468	0,064587
96,3	0,1895	0,196781
70,44	0,1155	0,163969
91,23	0,1631	0,178779

MFS= massa foliar seca (g); MOE= massa de óleo essencial (g); ROE= rendimento de óleo essencial (%).