

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA VEGETAL)**

---

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS  
SECUNDÁRIOS DE DUAS ESPÉCIES DE *Croton* SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA  
HÍDRICA E ALAGAMENTO**

**VÂNIA TOMAZELLI DE LIMA**

**RIO CLARO – SP**

**2022**

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA VEGETAL)**

---

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS  
SECUNDÁRIOS DE DUAS ESPÉCIES DE *Croton* SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA  
HÍDRICA E ALAGAMENTO**

**VÂNIA TOMAZELLI DE LIMA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Marta Kolb

Coorientadora: Profa. Dra. Silvana de Paula Quintão Scalon

**RIO CLARO – SP**

**2022**

L732r

Lima, Vânia Tomazelli de

Respostas morfofisiológicas e produção de compostos secundários de duas espécies de Croton submetidas à deficiência hídrica e alagamento / Vânia Tomazelli de Lima. -- Rio Claro, 2022

94 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Rosana Marta Kolb

Coorientadora: Silvana de Paula Quintão Scalon

1. Ecofisiologia vegetal. 2. Estresse hídrico. 3. Fotossíntese. 4. Compostos fenólicos. 5. Enzimas antioxidantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS DE DUAS ESPÉCIES DE Croton SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA E ALAGAMENTO

**AUTORA: VÂNIA TOMAZELLI DE LIMA**

**ORIENTADORA: ROSANA MARTA KOLB**

**COORIENTADORA: SILVANA DE PAULA QUINTÃO SCALON**

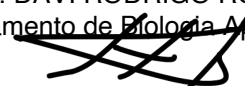
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), área: Biologia Vegetal pela Comissão Examinadora:




Profa. Dra. ROSANA MARTA KOLB (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas / UNESP Faculdade de Ciências e Letras de Assis SP



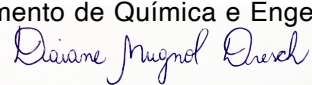
Prof. Dr. DAVI RODRIGO ROSSATTO (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. ETENALDO FÉLPE SANTIAGO (Participação Virtual)  
Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais / Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS



Professor Adjunto CLAUDIA ANDREA LIMA CARDOSO (Participação Virtual)  
Departamento de Química e Engenharia Ambiental / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. DAIANE MUGNOL DRESCH (Participação Virtual)  
Reitoria / Universidade Federal da Grande Dourados

Rio Claro, 09 de maio de 2022

**Aos meus pais, José de Lima (saudade eterna) e Maria Tomazelli Lima, meu esposo  
Antonio Luiz Viegas Neto e meu filho Tiago Tomazelli Viegas, dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado chegar até aqui, por acalmar meu coração nos momentos desafiadores ao longo desses quatro anos.

À minha orientadora, professora Dra. Rosana Marta Kolb, por acreditar em mim e aceitar me orientar à distância. Por todo apoio, compreensão, ensinamentos e dedicação dispendidos na orientação deste trabalho. Que um dia eu seja uma profissional digna da mesma admiração.

À professora Dra. Silvana de Paula Quintão Scalon, que prontamente me aceitou coorientar. Obrigada por acreditar no meu potencial, por todo apoio, compreensão, ensinamentos e dedicação dispendidos na coorientação deste trabalho. Obrigada por ser essa mãezona e pelos momentos de lazer que tornaram essa jornada mais leve.

À professora Dra. Cláudia Andrea Lima Cardoso, por me ajudar nas análises dos compostos secundários.

Aos meus amigos do GEEP (Grupo de Estudos em Ecofisiologia de Plantas), pela parceria, ajuda nas instalações dos experimentos e análises laboratoriais e por todo o apoio concedido durante o doutorado. Obrigada também pelos momentos de lazer que tornaram essa jornada mais leve.

Ao meu querido e amado esposo, por todo apoio, compreensão, palavras de incentivo e por me ajudar nos momentos que eu mais precisei. Por segurar a barra quando precisei me ausentar para ir a Rio Claro cursar as disciplinas. Obrigada pelo nosso bem mais precioso, nosso filho Tiago, e por ser esse papaizão para ele, cuidando dele enquanto escrevia essa tese.

Ao meu filho Tiago, que chegou durante o doutorado, em meio a pandemia e me trouxe o título de mãe, motivo de muita alegria e força para seguir em frente e me tornar uma pessoa cada vez melhor.

À minha mãe e meus irmãos, por todo apoio, carinho e amor incondicional. Vocês são a minha base. Obrigada por sempre se preocuparem comigo.

Às vovós Maria e Izabel e ao vovô João por cuidarem tão bem do meu filho enquanto eu precisei me ausentar para concluir o doutorado.

Às amigas de Rio Claro, Mariana, Laila, Amanda e Raquel, que me acolheram mesmo sem me conhecer. Obrigada por confiarem em mim, pela hospitalidade sempre que precisei e pela amizade. Vocês foram anjos que Deus colocou no meu caminho.

Aos meus amigos da Comunidade Batista da Paz, pelas palavras de apoio e encorajamento e pelas orações sempre que precisei.

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

Esse trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês! Muito obrigada!

## RESUMO

*Croton floribundus* e *C. urucurana* são comumente utilizadas em restauração de florestas, além de possuírem importância medicinal, devido à produção de metabólitos secundários bioativos. Ocorrem em locais com diferentes disponibilidades hídricas do solo, o que pode interferir direta ou indiretamente em seus metabolismos. Com isso, nosso objetivo foi avaliar aspectos do metabolismo primário e secundário dessas duas espécies de *Croton* sob estresse hídrico (déficit e alagamento) e investigar suas capacidades de recuperação após o alagamento. No capítulo 1 objetivamos avaliar alterações metabólicas relacionadas à fotossíntese e defesa antioxidante das duas espécies de *Croton* sob diferentes capacidades de retenção de água do solo (CRAs - 25%, 50%, 75% e 100%) e tempos de avaliação (30, 60 e 90 dias). Todas as plantas de *C. floribundus* cultivadas sob 25% de CRAs morreram antes da avaliação dos 30 dias. Sob 50% de CRAs as plantas sobreviveram, mas não cresceram ao longo dos 90 dias, apresentando redução da capacidade fotossintética, de metabólitos secundários e de sua atividade antioxidante, bem como aumento de prolina e da atividade de enzimas antioxidantes. As plantas de *C. urucurana* sobreviveram sob 25% de CRAs, mas não cresceram. Sob 25 e 50% de CRAs a capacidade fotossintética reduziu significativamente até os 90 dias. As plantas sob 25% de CRAs apresentaram maior redução na quantidade de metabólitos secundários e na atividade antioxidante, e aumento da atividade de enzimas antioxidantes até os 60 dias e posterior redução das enzimas aos 90 dias, com aumento de prolina. Ambas as espécies recuperaram o conteúdo relativo de água nas folhas aos 90 dias. Nossos resultados demonstram que *C. floribundus* é mais sensível ao déficit hídrico, e que o aumento de prolina e da atividade de enzimas antioxidantes podem contribuir para a tolerância à seca em ambas as espécies de *Croton*, contudo o déficit hídrico diminuiu o conteúdo de compostos secundários em ambas as espécies. No capítulo 2, estudamos o efeito de diferentes tempos de exposição das plantas ao alagamento em relação à sobrevivência e metabolismo primário e secundário das espécies, bem como o potencial de recuperação após cada período de alagamento. Diferentemente de *C. urucurana*, as plantas de *C. floribundus* sobreviveram ao alagamento apenas por 60 dias e ao pós-alagamento desse período. Em ambas as espécies, o alagamento reduziu a capacidade fotossintética, a eficiência fotoquímica do fotossistema II e limitou o crescimento da parte aérea e da raiz, entretanto, esses parâmetros indicaram recuperação das plantas no pós-alagamento. Adicionalmente, o alagamento aumentou o teor dos metabólitos secundários, a atividade antioxidante, o conteúdo de prolina e a atividade das enzimas antioxidantes. Em ambas as espécies não houve aumento da atividade da enzima álcool desidrogenase. Assim, concluímos

que *C. floribundus* é mais sensível ao alagamento quando comparada ao seu par congênico, que os mecanismos de adaptação ao alagamento estão relacionados à plasticidade fenotípica das espécies, incluindo a formação de lenticelas caulinares hipertróficas e raízes adventícias, modificações do metabolismo primário e secundário, e produção de moléculas protetoras como a prolina.

**Palavras-chave:** inundação, seca, fotossíntese, biomassa, compostos fenólicos, enzimas antioxidantes, prolina.

## ABSTRACT

*Croton floribundus* and *C. urucurana* are commonly used in forest restoration, in addition to having medicinal importance, due to the production of bioactive secondary metabolites. They occur in areas with different soil water availability, which can directly or indirectly interfere with their metabolism. Our objective was to evaluate the primary and secondary metabolism of these two *Croton* species under water stress (deficit and flooding), and to investigate their recovery capacities after flooding. In Chapter 1, we evaluated the metabolic alterations related to photosynthesis and antioxidant defense of the two *Croton* species under different soil water holding capacities (WHC - 25%, 50%, 75%, and 100%) and evaluation times (30, 60, and 90 days). All *C. floribundus* plants grown under 25% of WHC died before the 30-day evaluation. At 50% of WHC, the plants survived, but did not grow over the 90 days, showing reduced photosynthetic capacity, reduced secondary metabolites and antioxidant activity, and increased proline and antioxidant enzyme activity. *C. urucurana* plants survived at 25% of WHC, but did not grow. Under 25 and 50% of WHC, the photosynthetic capacity was significantly reduced up to 90 days. Plants grown at 25% of WHC showed a greater reduction in the amount of secondary metabolites and antioxidant activity, increased activity of antioxidant enzymes up to 60 days, with subsequent reduction of enzymes at 90 days, with a rise in proline. Both species recovered the relative water content in the leaves at 90 days. Our results demonstrate that *C. floribundus* is more sensitive to water deficit, that the increase in proline and antioxidant enzyme activity may contribute to drought tolerance in both *Croton* species, and that the water deficit decreased the content of secondary compounds in both species. In Chapter 2, we studied the effect of different periods of exposure of plants to flooding on their survival and primary and secondary metabolism of species, as well as the potential for post-flood recovery. Unlike *C. urucurana*, *C. floribundus* plants survived the flooding for only 60 days and the post-flooding period. In both species, flooding reduced the photosynthetic capacity, photochemical efficiency of photosystem II and limited the growth of the aerial part and roots; however, these parameters indicated recovery of plants after flooding. Moreover, flooding increased the content of secondary metabolites, antioxidant activity, proline, and the activity of antioxidant enzymes. In both species, no increase was observed in the alcohol dehydrogenase enzyme activity. Thus, *C. floribundus* is more sensitive to flooding compared to its congeneric pair, and the mechanisms of adaptation to flooding are related to the phenotypic plasticity of the species, including the formation of hypertrophic stem lenticels and adventitious roots, changes in primary and secondary metabolism, and production of protective molecules such as proline.

**Keywords:** antioxidant enzymes, biomass, drought, flood, phenolic compounds, photosynthesis, proline.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>11</b>
1.1	Das espécies estudadas .....	11
1.2	Estresse hídrico e metabolismo primário .....	12
1.3	Estresse hídrico e metabolismo secundário .....	16
1.4	Questões norteadoras da tese e hipóteses .....	17
1.5	Estrutura da tese .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>19</b>
2.1	Objetivos específicos .....	19
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>20</b>

<b>CAPÍTULO 1: Alterações do metabolismo primário e secundário de duas espécies de <i>Croton</i> em resposta ao déficit hídrico<sup>1</sup></b> .....			<b>27</b>
<b>Resumo</b> .....			<b>27</b>
<b>Introdução</b> .....			<b>28</b>
<b>Material e métodos</b> .....			<b>30</b>
	Material vegetal e procedimento experimental .....		30
	Sobrevivência de mudas .....		31
	Parâmetros fotossintéticos .....		32
	Conteúdo relativo de água e prolina .....		32
	Parâmetros de crescimento .....		33
	Análise enzimática e proteína total .....		33
	Compostos do metabolismo secundário e atividade antioxidante .....		34
	Análise estatística .....		34
<b>Resultados</b> .....			<b>35</b>
	Plantas sobreviventes .....		35
	Parâmetros fotossintéticos .....		35
	Conteúdo relativo de água e de prolina nas folhas .....		36
	Parâmetros de crescimento .....		37
	Atividade enzimática .....		41
	Compostos do metabolismo secundário e atividade antioxidante .....		42
<b>Discussão</b> .....			<b>44</b>
<b>Conclusão</b> .....			<b>47</b>
<b>Referências</b> .....			<b>48</b>
<b>Material suplementar</b> .....			<b>56</b>

<b>CAPÍTULO 2: O alagamento afeta a sobrevivência e o metabolismo de duas espécies de <i>Croton</i>?<sup>1</sup></b> .....	<b>59</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>59</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>60</b>
<b>Material e métodos</b> .....	<b>63</b>
Material vegetal e procedimento experimental.....	63
Sobrevivência de mudas e alterações morfológicas .....	64
Parâmetros fotossintéticos .....	64
Conteúdo relativo de água e prolina foliar.....	64
Parâmetros de crescimento .....	65
Análise enzimática e proteína total .....	65
Compostos do metabolismo secundário e atividade antioxidante .....	66
Análise estatística .....	67
<b>Resultados</b> .....	<b>67</b>
Mudas sobreviventes e alterações morfológicas.....	67
Parâmetros fotossintéticos .....	68
Conteúdo relativo de água e de prolina nas folhas .....	71
Parâmetros de crescimento .....	72
Atividade enzimática .....	74
Compostos do metabolismo secundário e atividade antioxidante .....	76
<b>Discussão</b> .....	<b>80</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>84</b>
<b>Referências</b> .....	<b>84</b>
<b>Material suplementar</b> .....	<b>90</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Das espécies estudadas

O gênero *Croton* é um dos maiores da família Euphorbiaceae, com cerca de 1200 espécies amplamente distribuídas entre as Américas, África e Ásia (CARUZO et al., 2019; SALATINO et al., 2007). Estudos realizados com algumas espécies de *Croton* têm revelado seu grande potencial para a farmacologia, devido à presença de constituintes químicos como terpenoides, flavonoides e alcaloides (AQUINO et al., 2017; CORDEIRO et al., 2012; ROCHA et al., 2008; COSTA et al., 2007). Além dos flavonoides, outros compostos fenólicos têm sido frequentemente relatados, como os lignoides e as proantocianidinas (LOPES et al., 2012).

Além de apresentarem atividades farmacológicas, muitas espécies de *Croton* crescem, predominantemente, em locais perturbados, tais como beira de estradas, margem de rios e clareiras de matas (LIMA e PIRANI, 2008). Essas e outras características ecológicas, como o crescimento rápido, a produção massiva de flores e frutos durante a maior parte do ano, fazem dos membros do gênero candidatos ideais para a restauração de florestas degradadas (DURIGAN et al., 2002).

*Croton urucurana* Baillon é conhecida popularmente como sangra d'água, pau de sangue e urucurana. É uma árvore de crescimento rápido, podendo ser encontrada nos seguintes domínios fitogeográficos: Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica. É abundante em diversas formações florestais brasileiras, como Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila, e principalmente Floresta Ciliar ou de Galeria, e com ampla distribuição geográfica, ocorrendo no Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Maranhão), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) do Brasil (CORDEIRO et al., 2015). Tolerância a encharcamento e inundações, mas ocorre também em clareiras e bordas de mata, em terrenos secos de encosta, sendo resistente a geadas fracas (DURIGAN et al., 2002). A espécie é utilizada em reflorestamentos com finalidade de recuperação de áreas, como sombreadora de espécies mais tardias, especialmente na composição de matas ciliares, em solos secos, mesmo em regiões de cerradão (DURIGAN et al., 2002).

A espécie é etnofarmacologicamente usada como anti-hemorrágica, anti-inflamatória, antisséptica, antiviral e cicatrizante (PASA et al., 2005; RANDAU et al., 2002). Cordeiro et al. (2016) avaliaram o extrato metanólico da casca de *C. urucurana* e este apresentou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Os autores concluíram que esses efeitos podem estar

relacionados com a presença de alcaloides e/ou flavonoides no extrato. Os flavonoides são úteis no tratamento da inflamação, principalmente devido a sua capacidade de regular a atividade de enzimas e a síntese de substâncias envolvidas nesse processo (COUTINHO et al., 2009). *C. urucurana* também possui atividade antiaderente (BARBIERI et al., 2014), antiulcerogênica (CORDEIRO et al., 2012), antifúngica (GURGEL et al., 2005), antibacteriana (SOLDERA et al., 2010), entre outras.

*Croton floribundus* Spreng, conhecida popularmente como capixingui, é uma planta arbórea cuja madeira é indicada para carpintaria e tabuado em geral (RAMOS et al., 2008). É nativa do Brasil, ocorrendo na Mata Atlântica, em área antrópica, Floresta Ciliar ou de Galeria, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila. Tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo no Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco), Centro-Oeste (Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná) do Brasil (CORDEIRO et al., 2015). As flores são melíferas e a árvore é útil para composição de plantios mistos em reflorestamentos de áreas degradadas, em sistemas agroflorestais e silviagrícolas (CARVALHO, 2014). Além disso, tem sido usada como medicinal devido à presença de metabólitos secundários (NICODEMO et al., 2016). Nesse contexto, Uchôa et al. (2013) isolaram dois tipos de diterpenos da raiz de *C. floribundus* e estes apresentaram atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais. Adicionalmente, Medina et al. (2009) avaliaram a atividade moluscicida dos extratos de *C. floribundus* e os resultados indicaram que as folhas e a casca apresentam agentes moluscicidas.

## 1.2 Estresse hídrico e metabolismo primário

As plantas em seu ambiente natural estão sujeitas a condições adversas, passando por períodos de estresse breves ou duradouros (GURURANI et al., 2015; HENRIQUE et al., 2010). Além disso, devido às mudanças climáticas globais, causadas por atividades antropogênicas, como desmatamento e aumento do efeito estufa, a distribuição e a frequência das chuvas têm variado nos últimos anos, e isso pode afetar a atividade fisiológica das plantas em suas diferentes fases de crescimento (MENEZES-SILVA et al., 2019).

Entre os habitats mais ameaçados pelas mudanças climáticas, estão os hotspots de biodiversidade, como a Mata Atlântica, local de ocorrência de *C. urucurana* e *C. floribundus*. Apenas 11,6% da cobertura natural da vegetação permanecem, e em um estado intensamente fragmentado, o que resulta em alta vulnerabilidade desse bioma às mudanças climáticas (SCARANO e CEOTTO, 2015). Além disso, esses fragmentos ocorrem em declives

acentuados, dominados por pedoformas côncavas e convexas, capazes de alterar as condições locais do microclima (MEDEIROS et al., 2020).

Outro hotspot de ocorrência de *C. urucurana* é a savana brasileira (Cerrado). Esta é composta de um mosaico de fisionomias que variam de campos abertos a florestas fechadas. Mas ao contrário da vegetação típica do Cerrado, onde arbustos e pequenas árvores são submetidos a uma longa estação seca, florestas ribeirinhas e de galeria têm maior disponibilidade de água no solo ao longo do ano (KISSMANN et al., 2012). Nesse bioma, *C. urucurana* é encontrada tanto em matas de galeria quanto em clareiras e bordas de matas e em terrenos secos de encosta (DURIGAN et al., 2002), ocorrendo, portanto, em solos com diferentes disponibilidades hídricas. Essas diferentes disponibilidades hídricas no solo podem interferir direta ou indiretamente no metabolismo das plantas, e a compreensão dos processos fisiológicos e dos mecanismos de adaptação e aclimatação a estresses ambientais é de grande importância para a agricultura e o ambiente (CAMPELO et al., 2018).

Diante deste cenário, as adaptações morfofisiológicas das plantas têm se tornado alvo de pesquisas, entretanto, mais estudos são necessários, pois as espécies desenvolvem características próprias que podem influenciar no seu desenvolvimento. Além da variabilidade genética, a adaptabilidade das plantas a condições de estresse é influenciada pela duração e magnitude do mesmo (FAROOQ et al., 2014).

A água é essencial para o desenvolvimento das plantas e sua falta ou excesso pode causar estresse hídrico e a capacidade das plantas de tolerar a seca ou o alagamento envolve mecanismos de aclimatação e adaptação que resultam de eventos integrados que ocorrem em diferentes níveis de organização. Em condições de baixa disponibilidade de água no solo, vários processos metabólicos das plantas podem ser influenciados. Se a planta perde água a uma taxa superior à sua capacidade de absorção e transporte, o potencial hídrico da folha diminui, ocorre fechamento dos estômatos, redução da condutância estomática e transpiração, e redução da fotossíntese, resultando no declínio da taxa de crescimento (SASANI et al., 2021; PADILHA et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2013; SCALON et al., 2011).

Quando a queda fotossintética é atribuída à limitação estomática, ocorre um declínio na concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), devido a menor capacidade da planta de obtê-lo, em contrapartida, se a  $C_i$  aumenta concomitantemente ao declínio na taxa de fotossíntese, as mudanças na fotossíntese são atribuídas principalmente à limitação não estomática (LIU et al., 2014). No caso de limitações não estomáticas, a fotossíntese pode diminuir por diferentes fatores, tais como, pela diminuição do teor e da atividade da enzima ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), pela diminuição dos pigmentos fotossintéticos, como

clorofila e carotenoides, inibição do transporte fotossintético de elétrons e da fosforilação fotossintética, desordens metabólicas de oxigênio ativo, aumento de etileno e outros hormônios (LIU et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Em algumas plantas lenhosas, que apresentam fortes reduções em condutância estomática e transpiração quando expostas ao déficit hídrico, a ascensão de seiva pode ser favorecida pela síntese ou pelo acúmulo de solutos osmoticamente ativos nas células. Dentre eles, destacam-se a prolina e outros aminoácidos (KUDOYAROVA et al., 2013; REDDY et al., 2004; TAMURA et al., 2003). A prolina é conhecida como agente osmorregulador em muitas espécies de plantas, e o seu acúmulo diminui o potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ), o que aumenta a capacidade de absorção de água das plantas e atenua os efeitos do déficit hídrico no conteúdo relativo de água da planta (HABERMANN et al., 2008; PAGTER et al., 2005). Nesse contexto, Silva et al. (2004) observaram que na estação seca, *Croton campestris* apresentou baixa taxa de transpiração e maiores concentrações de prolina nas folhas.

Sob estresse hídrico severo, as plantas frequentemente apresentam um marcante efeito fotoinibitório, caracterizado por decréscimo significativo no funcionamento dos fotossistemas (RODRIGUES et al., 2019; ARAÚJO e DEMINICIS, 2009); além disso, o estresse hídrico leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que apesar de possuírem papel chave nos mecanismos de percepção e conseqüentemente fuga ao estresse em espécies de plantas tolerantes, estão associadas a danos às células e tecidos das espécies de plantas com algum nível de suscetibilidade (SANTOS et al., 2022). Para controle do nível de EROs e proteção celular, os tecidos vegetais utilizam-se de sistemas enzimáticos, compostos pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e do guaiacol (POD), glutathione redutase (GR) e polifenoloxidase (PPO) (AMARAL et al. 2021; CANDAN e TARHAN 2012). Moraes et al. (2015) estudando *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) observaram que o déficit hídrico induzido por polietilenoglicol (PEG) aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT.

Além dos sistemas enzimáticos, as plantas se utilizam de sistemas não enzimáticos, como glutathione, ácido ascórbico e compostos fenólicos (BARBOSA et al., 2014). Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOUZA et al., 2007). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química (KHATER et al. 2019; AQUINO et al., 2017; CHUN et al., 2005; ZHENG e WANG, 2001). A biossíntese e o acúmulo de polifenóis e outros metabólitos secundários em plantas são considerados respostas evolutivas das vias bioquímicas

sob influências ambientais desfavoráveis, como o estresse hídrico (SELMAR e KLEINWÄCHTER, 2013).

Por outro lado, o excesso de água no solo gera um ambiente com pouca disponibilidade de oxigênio para as raízes das plantas. Estas podem evitar o estresse facilitando a entrada de oxigênio para seus tecidos por meio de lenticelas hipertrofiadas, estruturas caulinares que proporcionam maior superfície de contato com a atmosfera (MARCÍLIO et al., 2019; KOLB et al., 1998). A deficiência de oxigênio também pode levar a mudanças no metabolismo respiratório das raízes (KREUZWIESER et al., 2004), como a aceleração da glicólise com produção de etanol, principalmente. O etanol é o produto final da fermentação alcoólica, catalisada pela enzima álcool desidrogenase (ADH). Joly (1982) estudando *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) observou significativo aumento na atividade da ADH e no nível de etanol em raízes de plantas inundadas.

Além dessas características, as raízes tendem a crescer próximas à superfície do solo, e consequentemente, não exploram totalmente o volume de solo (SOUZA et al., 2013). Assim, uma das estratégias de uma espécie para se manter viva em habitats temporariamente inundados é o desenvolvimento de raízes longas ou maior acúmulo de biomassa nas mesmas, o que pode ser um fator decisivo, que define a composição de espécies nesses habitats, visto que raízes mais profundas são mais resistentes a condição de pós-alagamento, quando a disponibilidade hídrica é normalizada (LOPEZ e KURSAR, 2003), favorecendo assim a sobrevivência dos indivíduos.

Durante o alagamento também é possível verificar a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs). As EROs são originadas pelo metabolismo aeróbio, e em pequenas quantidades tem função de sinalizar a hipóxia, além de participarem no processo de morte celular programada e formação de aerênquima (VOESENEK e BAILEY-SERRES, 2015). No entanto, o desequilíbrio entre a produção e o consumo de EROs pode afetar a sobrevivência da célula vegetal, principalmente pela oxidação de lipídios, proteínas de membrana e ácidos nucleicos, de modo que a proteção celular é ativada por meio, principalmente, de um sistema enzimático antioxidante, como por exemplo a superóxido dismutase e peroxidase (WU et al., 2022; IRFAN et al., 2010). Entre as principais EROs que causam danos ao nível celular, podemos citar o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^-$ ) (WU et al., 2022; APEL e HIRT, 2004).

Estresse adicional pode ocorrer quando as plantas são desalagadas (reaeradas), período em que também pode haver o acúmulo de EROs. Segundo Bartosz (1997), plantas com capacidade antioxidante intensificada têm mais condições de tolerar diversos tipos de estresse.

Assim, a capacidade de tolerar o estresse oxidativo é considerada um fator importante para a proteção contra diferentes estresses ambientais, como o que ocorre logo após o alagamento. Portanto, é importante verificar não só a capacidade de sobrevivência das plantas ao alagamento em si, mas também a capacidade de recuperação de suas atividades fisiológicas após esse período.

### **1.3 Estresse hídrico e metabolismo secundário**

As alterações no metabolismo primário, e em processos essenciais, tais como fotossíntese, mobilização de reservas e crescimento, em função da falta ou excesso de água, podem levar a modificações no metabolismo secundário (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Os produtos do metabolismo secundário desempenham várias funções importantes nas plantas, como a defesa contra ataques de patógenos, herbívoros, competição entre plantas e atração de organismos benéficos, como polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbiotes. Além disso, possui ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz e deficiência de nutrientes minerais (PERES, 2004).

Em plantas medicinais, a menor disponibilidade hídrica no solo, por exemplo, pode causar significantes alterações no acúmulo e composição de compostos específicos. Segundo Selmar e Kleinwächter (2013), as concentrações de metabólitos secundários aumentam significativamente em plantas em condições de seca. Mas isso depende da intensidade do estresse e de seu tempo de duração, sendo que estresses de curto prazo parecem levar a uma produção aumentada, enquanto que nos de longo prazo é observado um efeito oposto (HORNER, 1990). Trabalhos que avaliaram a resposta de plantas medicinais submetidas ao estresse hídrico demonstraram significativa influência na produção de compostos secundários (ALVARENGA et al., 2011; BORTOLO et al., 2009; CARVALHO et al., 2003).

Existe uma grande quantidade de metabólitos secundários já identificados, e esses se dividem em três grandes grupos que se diferenciam quimicamente entre si, sendo eles: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (SOUSA e SOUSA, 2017). Os compostos fenólicos, presentes no gênero *Croton*, bem como em outras plantas, são divididos em flavonoides e não flavonoides e desempenham importantes funções nos vegetais como, defesa contra insetos e microrganismos fitopatogênicos, além de protegerem os vegetais contra estresses abióticos (SILVA, 2014; FARAH et al., 2006).

Além de desempenharem importantes funções nas plantas, o interesse nos metabólitos secundários tem aumentado devido à grande importância que possuem na indústria

farmacêutica, alimentícia, de bebidas, perfumaria e cosméticos (HOSTETTMAN et al., 2003). Entretanto, ainda são necessários estudos que integrem conhecimentos sobre fisiologia, bem como química de produtos naturais, como forma de identificar os compostos naturais, compreender os fatores que interferem no crescimento e no desenvolvimento de plantas que produzem princípios ativos que possuem diferentes interesses.

#### 1.4 Questões norteadoras da tese e hipóteses

Diante do exposto, as seguintes questões nortearam o desenvolvimento desta tese:

- 1- Plantas de *Croton floribundus* e *C. urucurana* são capazes de sobreviver ao déficit hídrico, com diferentes intensidades, e ao alagamento por 90 dias?
- 2- As respostas morfofisiológicas das plantas aos estresses diferem entre as espécies em estudo?
- 3- Quais são as características morfofisiológicas das plantas que permitem que este par congênico possa habitar em locais com distinta disponibilidade hídrica?
- 4- A produção de compostos secundários foliares será afetada pelos estresses?

Hipóteses:

- 1- A capacidade de sobreviver ao déficit hídrico dependerá do conteúdo relativo de água do solo (intensidade da deficiência) e do tempo de exposição a essa condição, do mesmo modo, a capacidade de sobreviver ao alagamento dependerá do tempo de exposição. Acreditamos que ambas as espécies sofram com o déficit hídrico mais severo (conteúdo relativo de água no solo menor que 50%) e que resistam ao alagamento, já que são naturalmente encontradas em ambientes sujeitos ao alagamento;
- 2- As respostas morfofisiológicas das mudas sob estresse irão diferir entre as espécies afetando a capacidade de crescimento e mudas sobreviventes;
- 3- Acreditamos que as espécies apresentem certa plasticidade, que inclua modificações do metabolismo enzimático (aumento da atividade de ADH em plantas alagadas e da atividade de enzimas antioxidantes em plantas com deficiência hídrica ou reaeradas após alagamento) e produção de moléculas protetoras (prolina sob déficit hídrico) pelas plantas de *C. urucurana* e *C. floribundus*, propiciando sua sobrevivência sob estresse e recuperação de seu crescimento após período de alagamento;
- 4- Acreditamos que ocorra alteração no teor de compostos secundários, com aumento sob condições mais amenas de estresse e decréscimo em condições mais severas de estresse.

### **1.5 Estrutura da tese**

Esta tese é composta por dois capítulos, sendo que o primeiro visa avaliar os metabolismos primário e secundário de *C. floribundus* e *C. urucurana* sob diferentes capacidades de retenção de água do solo (CRAs - 25%, 50%, 75% e 100%) e tempos de avaliação (30, 60 e 90 dias). O segundo visa avaliar o efeito de diferentes tempos de exposição ao alagamento (30, 60 e 90 dias) sobre a sobrevivência e metabolismos primário e secundário desse par congênico, bem como seu potencial de recuperação após cada período de alagamento. Esses capítulos estão no formato de artigo, portanto, estão nas normas da revista a qual serão submetidos.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da disponibilidade hídrica, tanto a falta quanto o excesso, sobre o crescimento, características morfofisiológicas foliares e produção de metabólitos secundários em folhas de duas espécies congênicas (*Croton urucurana* e *C. floribundus*) e investigar a capacidade de recuperação das mesmas após o restabelecimento normal da disponibilidade hídrica, fornecendo informações sobre a tolerância e/ou suscetibilidade e possibilidade de plantio em locais sujeitos a estresse (de diferentes intensidades e duração).

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento e as características morfofisiológicas foliares (trocas gasosas, fluorescência da clorofila-*a*, conteúdo relativo de água na folha e de prolina) durante os regimes hídricos, a fim de detectar estratégias de tolerância das espécies;

- Analisar se a atividade das enzimas antioxidantes e ADH favoreceu a sobrevivência durante os estresses e se as enzimas antioxidantes auxiliaram o potencial de recuperação das mudas após o alagamento (reaeração);

- Investigar se os estresses influenciaram a produção de compostos secundários pelas folhas de *C. urucurana* e *C. floribundus*.

### 3 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. P. F.; MORAES, F. K. C.; SANTOS, R. I. N.; CASTRO, G. L. S.; RAMOS, E. M. L. S.; PINHEIRO, H. A. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno-africano submetidas a déficit hídrico e reidratação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 1, p. 9-16, 2013.
- AQUINO, V. V. F., COSTA, J. G. M., ANGÉLICO, E. C., MEDEIROS, R. S., LUCENA, M. D. F. A., RODRIGUES, O. G. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus*. *Acta Brasiliensis*, v. 1, n. 3, p. 28-31, set. 2017.
- ALVARENGA, I. C. A.; VALADARES, R. V.; MARTINS, E. R.; OLIVEIRA, F. G.; FIGUEIREDO, L. S. D.; KOBAYASHI, M. K. Water stress before harvest of pepper-rosmarin. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, n. 7, p. 706-711, 2011.
- AMARAL, G. C.; PEZZOPANE, J. E. M.; NÓIA JÚNIOR, R. S.; FONSECA, M. D. S.; TOLEDO, J. V.; XAVIER, T. M. T.; OLIVEIRA, B. S.; MARTÍNEZ, M.F.; JERÔNIMO JÚNIOR, R. A. C.; GONÇALVES, E. O. Ecophysiology of *Pilocarpus microphyllus* in response to temperature, water availability and vapour pressure deficit. *Trees*, v. 35, p. 543–555, 2021.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da Fotossíntese. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 7, n. 4, p. 463-472, 2009.
- BARBIERI, D. S. V.; TONIAL, F.; LOPEZ, P. V. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; SANTOS, G. D.; RIBAS, M. O.; GLIENKE, C.; VICENTE, V. A. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on *in vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, v. 59, p. 887-896, 2014.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologia Plantarum*, v. 19, n. 1, p. 47-64, 1997.
- BORTOLO, D.; MARQUES, P.; PACHECO, A. Teor e rendimento de flavonoides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 11, n. 4, p. 435-441, 2009.
- CAMPELO, D. H.; LACERDA, C. F.; SOUSA, J. A.; BEZERRA, A. M. E.; ARAÚJO, J. D. M.; NEVES, A. L. R.; SOUSA, C. H. C. Características morfofisiológicas foliares e estado nutricional de seis espécies lenhosas em função da disponibilidade de água no solo. *Ciência Florestal*, v. 28, n. 3, p. 924-936, 2018.

CANDAN, N.; TARHAN, L. Tolerance or sensitivity responses of *Mentha pulegium* to osmotic and water logging stress in terms of antioxidant defense systems and membrane lipid peroxidation. *Environmental Experimental Botany*, v. 75, p. 83-88, 2021.

CARUZO, M. B. R.; PEREIRA, A. P. N.; CORDEIRO, I. *Croton* (Euphorbiaceae) in the State of São Paulo, Brazil: an update. *Hoehnea*, n. 46, v. 1, p. 1-7, 2019.  
<https://doi.org/10.1590/2236-8906-91/2018>

CARVALHO, L. M. D.; CASALI, V. W. D.; DE SOUZA, M. A.; CECON, P. R. Disponibilidade de água no solo e crescimento de artemísia. *Horticultura Brasileira*, v. 21, n. 4, p. 726-730, 2003.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2014. v. 5, p. 497-505.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 809-816, 2005.

CORDEIRO, K. W.; PINTO, L. A.; FORMAGIO, A. S. N.; ANDRADE, S. F.; KASSUYA, C. A. L.; FREITAS, K. C. Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, p. 331–337, 2012.

CORDEIRO, K. W.; FELIPE, J. L.; MALANGE, K. F.; PRADO, P. R.; FIGUEIREDO, P. O.; GARCEZ, F. R.; FREITAS, K. C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 183, p. 128–13, 2016.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; CARNEIRO-TORRES, D. S.; LIMA, L. R. DE, CARUZO, M.B.R., BERRY, P., RIINA, R., SILVA, O.L.M., SILVA, M.J.DA, SODRÉ, R.C. 2015. *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17546>>.

COSTA, M. P.; MAGALHÃES N. S. S.; GOMES, F. E. S.; MACIEL, M. A. M. Uma revisão das atividades biológicas da transdesidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 17, p. 275-286, 2007.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DURIGAN, G.; FIGLIOLIA, M. B.; KAWABATA, M.; GARRIDO, M. A. O.; BAITELLO, J. B. *Sementes e mudas de árvores tropicais*. 2. ed. São Paulo: Instituto Florestal, 2002. 65 p.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V.; FRANCA, A.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemical*, v. 98, p. 373-380, 2006.

FAROOQ, M.; HUSSAIN, M.; SIDDIQUE, KHM. Drought stress in wheat during flowering and grain-filling periods. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 33, p. 331–349, 2014.

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

GURGEL L. A.; SIDRIM, J. J.; MARTINS, D. T.; CECHINEL, F. V.; RAO, V. S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 28, p. 409-12, 2005.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; TRAN, L. S. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular Plant*, v. 8, p. 1304-1320, 2015.

HABERMANN G.; MACHADO S. R.; GUIMARÃES, V. F.; RODRIGUES, J. D. Leaf heliotropism in *Styrax camporum* Pohl. from the Brazilian cerrado—distinct gas exchange and leaf structure, but similar leaf temperature and water relations. *Brazilian Journal of Plant Physiology* v. 20, p. 71–83, 2008.

HENRIQUE, P. C.; ALVES, J. D.; GOULART, P. F. P.; DEUNER, S.; SILVEIRA, N. M.; ZANANDREA, I.; CASTRO, E. M. Características fisiológicas e anatômicas de plantas de sibipiruna submetidas à hipóxia. *Ciência Rural*, v. 40, n. 1, p. 70-76, 2010.

HORNER, J. D. Nonlinear effects of water deficits on foliar tannin concentration. *Biochemistry*, n. 18, p. 211-213, 1990.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: UFSCar, 2003.

IRFAN, M.; HAYAT, S.; HAYAT, Q.; AFROZ, S.; AHMAD, A. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. *Protoplasma*, vol. 241, n. 1, p. 3-17, 2010.

JOLY, C. A. 1982. Flooding tolerance mechanisms of some brazilian trees. PhD. Thesis, University of St. Andrews, Scotland.

KHATER, M.; RAVISHANKAR, D.; GRECO, F.; OSBORN, H. M. Metal complexes of flavonoids: their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities. *Future Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 21, p. 2845-2867, 2019.

KISSMANN, C.; TOZZI H. H.; MARTINS, S.; HABERMANN, G. Germination performance of congeneric *Styrax* species from the Cerrado sensu lato areas and their distribution pattern in different physiognomies. *Flora*, v. 207, p. 673-681, 2012.

KOLB, R. M.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; GILONI, P. C.; CORREA, G. T. Anatomia ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith and Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 21, p. 305-312, 1998.

KREUZWIESER, J.; PAPADOPOULOU, E.; RENNENBERG, H. Interaction of flooding with carbon metabolism of forest trees. *Plant Biology*, v. 6, p. 299–306, 2004.

- KUDOYAROVA, G. R.; KLOLODOVA, V. P.; VESELOV, D. S. Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. *Journal Plant Physiology*, v. 60, p. 165-175, 2013.
- LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). *Biota Neotropica*, v. 82, p. 177- 231, 2008.
- LIU, Z. B.; CHENG, R. M.; XIAO, W. F.; GUO, Q. S.; WANG, N. Effect of off-Season flooding on growth, photosynthesis, carbohydrate partitioning, and nutrient uptake in *Distylium chinense*. *PloS One*, v. 9, n. 9, p. 1-9, 2014.
- LOPES, E. L.; NETO, M. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. *Química Nova*, v. 35, n. 11, p. 2169-2172, 2012.
- LOPEZ, O. R.; KURSAR, T. A. Does flood tolerance explain tree species distribution in tropical seasonally flooded habitats? *Oecologia*, v. 136, n. 2, p. 193–204, 2003.
- MARCÍLIO, T.; BARBEIRO, C.; FIRMINO, T. P.; ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, L. A.; PASTORINI, L. H. Flooding and submersion-induced morphological and physiological adaptive strategies in *Lonchocarpus cultratus*. *Aquatic Botany*, v. 159, p. 103146, 2019.
- MEDEIROS, A. S.; PEREIRA, M. G.; FREO, V. A.; BRAZ, D. M. Pedofoms Microclimate and Seasonal Forest Structure in Médio Vale do Paraíba. *Floresta e Ambiente*, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2020.
- MEDINA, J. M.; PEIXOTO, J. L. B.; SILVA, A. A.; HARAGUCHI, S. K.; FALAVIGNA, D. L. M.; ZAMUNER, M. L. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; VIDOTTI, G. J. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 1b, p. 207-211, 2009.
- MENEZES-SILVA, P. E.; LORAM-LOURENÇO, L.; ALVES, R. D. F. B.; SOUSA, L. F.; ALMEIDA, S. E. S.; FARNESE, F. S. Different ways to die in a changing world: Consequences of climate change for tree species performance and survival through an ecophysiological perspective. *Ecology and Evolution*, v.9, p. 11979-11999, 2019.
- MORAES, P. F.; LAAT, D. M.; SANTOS, M. E. A. H. P.; COLOMBO, C. A.; KIIHL, T. Expressão gênica diferencial em genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) submetidos a déficit hídrico induzido por PEG. *Bragantia*, v. 74, n. 1, p. 25-32, 2015.
- NICODEMO, M. L. F.; MULLER, M. D.; CARPANEZZI, A. A.; PORFÍRIO-DA-SILVA, V. Allometric models for estimating aboveground biomass and biomass allocation of capixingui trees (*Croton floribundus* Spreng.) in an agrisilvicultural system. *Revista Árvore*, v. 40, n. 2, p. 279-288, 2016.
- PADILHA, N. S.; SILVA, C. J.; PEREIRA, S. B.; SILVA, J. A. N.; HEID, D. M.; BOTTEGA, S. P.; SCALON, S. P. Q. Crescimento inicial do pinhão-manso submetido a diferentes regimes hídricos em Latossolo Vermelho Distrófico. *Ciência Florestal*, v. 26, n. 2, p. 513-521, 2016.

PAGTER, M.; BRAGATO, G.; BRIX, H. Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. *Aquatic Botany*, v. 81, p. 285-299, 2005.

PASA, M. C.; SOARES, J. J.; GUARIM NETO, G. Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Aricá Açu, MT, Brasil). *Acta Botânica Brasílica*, v. 19, n. 2, p. 195-207, 2005.

PERES, L. (2004) *Metabolismo secundário*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, 1-26p.

RAMOS, V. S.; DURIGAN, G.; FRANCO, G. A. D. C.; SIQUEIRA, M. F.; RODRIGUES, R. R. *Árvores da Floresta Estacional Semidecidual: guia de identificação de espécies*. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 2008. v. 1, 312 p.

RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; DIMECH, G. S.; WANDERLEY, A. G. Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespasmódica e antiulcerogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Revista Lecta*, v. 20, n. 1, p. 61-68, 2002.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

RODRIGUES, A. L.; BERTHOLDI, A. A. S.; MANTOAN, L. P. B.; FRANCO, D. M.; HABERMANN, G.; ALMEIDA, L. F. R. Seasonal dynamics of the water relations and photochemical efficiency of *Copaifera langsdorffii* Desf. co-occurring in savanna and seasonal forest. *Acta Physiologiae Plantarum* v. 41, p. 1-12, 2019

ROCHA, F. F.; NEVES, E. M. N.; COSTA, E. A.; MATOS, L. G.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; CORTES, W. S.; VANDERLINDE, F. A. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 344-349, 2008.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANTOS, J. S.; PONTES, M. S.; ARRUDA, G. J.; CAIRES, A. R. L.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; BUENO, M. L.; SILVA, V. F. B.; GRILLO, R.; SANTIAGO, E. F. Ecological aspects of aquatic macrophytes for environmental pollution control: An eco-remedial approach. In: *Phytoremediation Technology for the Removal of Heavy Metals and Other Contaminants from Soil and Water*. 2022. p. 497-523.

SASANI, N.; PÂQUES, L. E.; BOULANGER, G.; SINGH, A. P.; GIERLINGER, N.; ROSNER, S.; BRENDDEL, O. Physiological and anatomical responses to drought stress differ between two larch species and their hybrid. *Trees*, v. 35, p. 1467-1484, 2021.

- SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; EUZÉBIO, V. L. M.; KODAMA, F. M.; KISSMANN, C. Estresse hídrico no metabolismo e crescimento inicial de mudas de mutambo (*Guazuma ulmifolia* Lam.). *Ciência Florestal*, v. 21, n. 4, p. 655-662, 2011.
- SCARANO, F. R.; CEOTTO, P. Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. *Biodiversity and conservation*, v. 24, p. 2319–2331, 2015.
- SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, v. 42, p. 558-566, 2013.
- SILVA, M. A.; SANTOS, C. M.; VITORINO, H. S.; RHEIN, A. F. L. Pigmentos fotossintéticos e índice spad como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. *Bioscience Journal*, v. 30, n. 1, p. 173-181, 2014.
- SILVA, E. C.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; NETO, A. D. A.; BRITO, J. Z.; CABRAL, E. L. Aspectos ecofisiológicos de dez espécies em uma área de caatinga no município de Cabaceiras, Paraíba, Brasil. *Iheringia, Série Botânica*, v. 59, n. 2, p. 201-205, 2004
- SOLDERA, C. C.; ZANELLA, G. N.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antibacteriana de *Croton urucurana*. *Revista Contexto & Saúde*, v. 10, n. 19, p. 25-31, 2010.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, T. C.; SOUZA, E. D.; DOUSSEAU, S.; CASTRO, E. M.; MAGALHAES, P. C. Seedlings of *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae) subjected to root flooding: physiological, morphoanatomical, and antioxidant responses to the stress. *Aquatic Botany*, v. 111, p. 43–49, 2013.
- SOUSA, R. F.; SOUSA, J. A. Metabólicos secundários associados a estresse hídrico e suas funções nos tecidos vegetais. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, v. 11, n. 1, p. 01-08, 2017.
- TAMURA, T.; HARA, K.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiology*, v. 131, p. 454-62, 2003.
- UCHÔA, P. K. S.; SILVA JR, J. N.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S. Trachylobane and kaurane diterpenes from *Croton floribundus* Spreng. *Química Nova*, v. 36, n. 6, p. 778-782, 2013.
- VOESENEK L. A. C. J.; BAILEY-SERRES J. Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist*, v. 206, n. 1, p. 57-73, 2015.
- WU, J.; WANG, J.; HUI, W.; ZHAO, F.; WANG, P.; SU, C.; GONG, W. Physiology of plant responses to water stress and related genes: A review. *Forests*, v. 13, p. 1-16, 2022.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 5165–5170, 2001.

## **CAPÍTULO 1: Alterações do metabolismo primário e secundário de duas espécies de *Croton* em resposta ao déficit hídrico<sup>1</sup>**

**Resumo** *Croton floribundus* e *C. urucurana* são espécies com ampla distribuição geográfica no país, ocorrendo em locais com diferentes disponibilidades hídricas do solo, o que pode interferir direta ou indiretamente em seus metabolismos. Assim, objetivamos avaliar as alterações metabólicas relacionadas à fotossíntese e defesa antioxidante em duas espécies de *Croton* sob diferentes capacidades de retenção de água do solo (CRAs - 25%, 50%, 75% e 100%) e tempos de avaliação (30, 60 e 90 dias). Todas as plantas de *C. floribundus* cultivadas sob 25% de CRAs morreram antes da avaliação dos 30 dias. Sob 50% de CRAs as plantas sobreviveram mas não cresceram ao longo dos 90 dias, apresentando redução de A, Gs, A/Ci, teor de alcaloides, compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, e aumento de prolina e da atividade das enzimas guaiacol peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD). As plantas de *C. urucurana* sobreviveram sob 25% de CRAs, mas não cresceram. Sob 50 e 25% de CRAs A, Gs, e A/Ci, reduziram significativamente até os 90 dias. As plantas sob 25% de CRAs apresentaram maior redução de alcaloides, compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, e aumento da atividade da POD e SOD até os 60 dias, e posterior redução aos 90 dias com aumento de prolina. Ambas as espécies recuperaram o conteúdo relativo de água nas folhas aos 90 dias. Concluímos que *C. floribundus* é mais sensível ao déficit hídrico, que o aumento de prolina e da atividade de enzimas antioxidantes podem contribuir para a tolerância à seca em ambas as espécies de *Croton*, e que o déficit hídrico diminuiu o conteúdo de compostos secundários em ambas as espécies.

**Palavras-chave** *Croton floribundus*, *Croton urucurana*, Seca, Fotossíntese, Compostos fenólicos, Enzimas antioxidantes

<sup>1</sup> Esse artigo será submetido na revista Trees.

## **Introdução**

As plantas em seu ambiente natural estão sujeitas a passar por estresse hídrico, o que pode se tornar mais frequente no cenário de mudanças climáticas globais (IPCC 2021; Gururani et al. 2015;). Esse estresse pode afetar a atividade fisiológica das plantas em suas diferentes fases de crescimento, pois a água é essencial para o seu desenvolvimento e sobrevivência (Menezes-Silva et al. 2019).

Quando expostas à deficiência hídrica, diferentes respostas podem ser observadas nas plantas, por exemplo, se a planta perde água a uma taxa superior à sua capacidade de absorção e transporte, o potencial hídrico da folha diminui, ocorre redução da condutância estomática e transpiração com o fechamento dos estômatos, bem como redução da fotossíntese, resultando no declínio da taxa de crescimento (Sasani et al. 2021; Menezes-Silva et al. 2019; Padilha et al. 2016). Quando isso acontece, pode ocorrer acúmulo de prolina, um soluto compatível para estabilizar membranas e manter a conformação de proteínas, o que impede a desidratação do citosol (Szabados e Saviouré 2010; Verbruggen e Hermans 2008; Kishor et al. 2005).

O estresse hídrico também leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que a despeito de possuírem papel chave nos mecanismos de percepção e consequentemente fuga ao estresse em espécies de plantas tolerantes, estão associadas a danos às células e tecidos das espécies de plantas com algum nível de suscetibilidade (SANTOS et al., 2022). Para controle do nível de EROs e proteção celular, os tecidos vegetais utilizam-se de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD) e a guaiacol peroxidase (POD) (Amaral et al. 2021; Búfalo et al. 2016; Candan e Tarhan 2012). Além dos sistemas enzimáticos, as plantas podem produzir compostos do metabolismo secundário, como os flavonoides que, de forma conjunta, atuam na eliminação das EROs e na redução do dano oxidativo (Agati et al. 2020; Fàbregas e Fernie 2019).

Essas alterações no metabolismo primário, e em processos essenciais, tais como fotossíntese, mobilização de reservas e crescimento, em função da falta de água, podem levar a modificações no metabolismo secundário (Gobbo-Neto e Lopes 2007). Segundo Selmar e Kleinwächter (2013), as concentrações de metabólitos secundários aumentam significativamente em plantas em condições de seca. Mas isso depende da suscetibilidade da planta, da intensidade do estresse e de sua duração, sendo que estresses de curto prazo parecem elevar a produção de metabólitos, enquanto que nos de longo prazo é observado um efeito oposto (Horner 1990).

Plantas que apresentam ampla distribuição geográfica estão mais sujeitas à heterogeneidade ambiental, podendo passar por episódios de deficiência hídrica, os quais podem ser mais prejudiciais para plantas nos estágios iniciais de vida (Lin et al. 2019; Ramírez-Valiente et al. 2010). *Croton floribundus* Spreng e *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) são espécies com ampla distribuição geográfica, ocorrendo em diversas formações vegetais. *C. floribundus* é encontrada em área antrópica, floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila e ciliar, bem como outras formações florestais do Brasil e leste do Paraguai (Cordeiro et al. 2015; Silvestrini et al. 2013). *C. urucurana* também é encontrada em floresta estacional semidecidual, mata ciliar e outras formações vegetais no Brasil e em outros países como, Paraguai, Argentina e Uruguai (Cordeiro et al. 2015; Barbieri et al. 2014; Durigan et al. 2002). Escolhemos esse par congênico para estudo porque são amplamente utilizadas em áreas de restauração florestal no Brasil, pois são espécies nativas de rápido crescimento, possuem flores melíferas e a madeira de *C. floribundus* é indicada para carpintaria e tabuado em geral (Ramos et al. 2008; Luchi 2004). Além disso, possuem importância medicinal, com produção de metabólitos secundários bioativos como, flavonoides e alcaloides (Cordeiro et al. 2016; Uchôa et al. 2013; Oliveira et al. 2008; Salatino et al. 2007). Apesar dos compostos e de suas atividades serem conhecidas, pouco se sabe sobre sua produção/variação sob estresse hídrico, sendo

importante conhecer a dinâmica de biossíntese desses compostos com importância farmacológica.

Assim, espera-se que essas espécies apresentem certa tolerância a episódios de déficit hídrico, sendo importante compreender suas estratégias a diferentes níveis de déficit hídrico (intensidade e duração), bem como conhecer o efeito da seca sobre seu metabolismo secundário.

Com isso, nosso objetivo foi avaliar o metabolismo primário e secundário de duas espécies congênicas de *Croton* frente ao déficit hídrico, a fim de saber se ambas as espécies são capazes de sobreviver a esse estresse, com diferentes intensidades e períodos, quais são os mecanismos que as permitirão continuar realizando os seus processos fisiológicos, e se a produção de compostos do metabolismo secundário aumenta ou diminui com a seca.

## **Material e métodos**

### **Material vegetal e procedimento experimental**

As sementes de *C. floribundus* e *C. urucurana* foram coletadas a partir de matrizes (mínimo de cinco) distribuídas em áreas remanescentes de Cerrado, no município de Dourados - Mato Grosso do Sul. As mudas foram produzidas de acordo com a disponibilidade de sementes, em número suficiente, para a realização dos experimentos. O período experimental com *C. floribundus* se deu de outubro de 2018 a janeiro de 2019 e com *C. urucurana*, de abril a julho de 2019. Os dados de temperatura e umidade relativa foram obtidos com termohigrômetro nos dias das avaliações experimentais. Para o período experimental com *C. floribundus* foram obtidas as seguintes medidas: temperatura aos 30, 60 e 90 dias de experimento, respectivamente: 30, 36 e 35°C; e umidade relativa do ar de : 38, 41 e 50%, respectivamente. Para o período experimental com *C. urucurana*, as temperaturas aos 30, 60 e 90 dias de experimento foram, respectivamente: 28, 24 e 22°C; e a umidade relativa do ar de 60, 41 e 40%, respectivamente.

Para produção de mudas, a semeadura foi realizada em tubetes 50 x 190 mm contendo Latossolo Vermelho distroférico, areia e substrato comercial Bioplant® na proporção de 1:1:1. Quando atingiram 15 cm (*C. floribundus*) e 25 cm (*C. urucurana*) de altura, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade para 6 litros, contendo Latossolo Vermelho distroférico e areia na proporção de 2:1. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação coberta com plástico transparente para proteção contra chuva. As mudas foram submetidas a diferentes tratamentos de capacidade de retenção de água do solo (CRAs), sendo que a de 100% foi determinada baseada na quantidade de água retida após a drenagem natural, e as de 25%, 50% e 75%, calculadas por meio de regra de três em função da massa, segundo a metodologia proposta por Souza et al. (2000). O controle da irrigação foi individualizado, em dias alternados, por meio de método gravimétrico, com água em quantidade suficiente para atingir a massa pré-estabelecida para cada CRAs.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado no esquema fatorial 4 x 3, sendo 4 níveis de CRAs (25%, 50%, 75% e 100%), e 3 tempos de avaliação (30, 60 e 90 dias). A CRAs de 25% simula estresse severo, a de 50% estresse moderado, a de 75% estresse leve e a de 100% simula uma condição ideal. As avaliações de trocas gasosas e conteúdo relativo de água na folha foram realizadas em seis réplicas, e as demais avaliações em quatro réplicas. A unidade experimental foi constituída por um vaso contendo uma muda. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

### **Sobrevivência de mudas**

O total de mudas sobreviventes foi computado ao término de cada período de tratamento.

### **Parâmetros fotossintéticos**

A taxa de absorção de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), condutância estomática ( $G_s$ ) e concentração interna de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) foram obtidas com analisador de gases no infravermelho (IRGA), marca ADC, modelo LCI PRO (Analytical Development Co. Ltda, Hoddesdon, UK). Com esses dados foi calculada a eficiência da carboxilação da Rubisco ( $A/C_i$ ) (Zhang et al. 2001). As leituras foram realizadas em folhas totalmente expandidas pertencentes ao terceiro par (do ápice para a base). As avaliações foram realizadas no período da manhã, entre 8 e 11h, sendo considerados apenas os dados medidos sob fluxo fotossintético de fótons ( $FFF$ ) maior que  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

A fluorescência da clorofila  $a$  foi dada pelos registros da eficiência quântica potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), mensurada com o auxílio do fluorímetro portátil, modelo OS-30p (Opti-Sciences Chlorophyll Fluorometer, Hudson, USA). A determinação da fluorescência foi realizada entre 8 e 11h da manhã, nas mesmas folhas utilizadas para as avaliações das trocas gasosas. As folhas foram submetidas a um período de 30 minutos de adaptação ao escuro, com o auxílio de cliques adaptadores, antes da realização das medidas. A radiação de excitação constituiu de um único flash de 1s a  $1.500 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### **Conteúdo relativo de água e prolina**

O conteúdo relativo de água da folha ( $CRA_f$ ) foi obtido usando discos foliares (coletados às 5h da manhã) de plantas submetidas a cada um dos tratamentos, e calculado pela seguinte fórmula:  $CRA_f(\%) = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$ , na qual  $MF$  é a massa fresca dos discos;  $MS$  é a massa seca após secagem em estufa e  $MT$  é a massa túrgida após hidratação dos discos por 24 horas em frascos escuros contendo água destilada, adaptado de Barrs e Weatherley (1962).

A extração de prolina foi realizada em amostras de folhas secas em estufa a 40°C e trituradas, de acordo com o método de Bates (1973).

### **Parâmetros de crescimento**

A massa seca da raiz e da parte aérea foi obtida com uso de estufa a 50°C, até massa constante, e balança analítica de precisão. A área foliar de cada planta foi obtida com o auxílio do equipamento LI-COR modelo LI-3100C e a altura da parte aérea e o comprimento da raiz medidos com régua graduada.

### **Análise enzimática e proteína total**

Para a preparação do extrato enzimático, 300 mg de folhas frescas foram trituradas em almofariz, com adição de 6 mL de solução de extração gelada, constituída de tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,0, contendo 1% de PVP (polivinilpirrolidona). Os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm, em centrífuga refrigerada, e os sobrenadantes coletados foram utilizados nas avaliações enzimáticas.

A atividade da guaicol peroxidase (POD) ( $\text{mg de proteína}^{-1}$ ) foi determinada por método espectrofotométrico direto, convertendo guaicol para tetraguaiacol a 470 nm (Hammerschmidt et al. 1982), usando um leitor de microplacas ELISA (modelo Expert Plus).

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) ( $\text{mg de proteína}^{-1}$ ) foi medida de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). As leituras de absorbância foram realizadas no comprimento de onda de 560 nm usando espectrofotômetro (Espectrofotômetro Visível Metash - modelo V5000).

A proteína total, necessária para calcular a atividade específica das enzimas estudadas, foi quantificada de acordo com a metodologia de Bradford (1976). As leituras de absorbância foram realizadas no comprimento de onda de 595 nm, usando espectrofotômetro (Espectrofotômetro Visível Metash - modelo V5000).

### **Compostos do metabolismo secundário e atividade antioxidante**

Os compostos foram quantificados a partir de folhas secas a 40°C e trituradas. A extração foi realizada por contato da amostra (100 mg) com 5 mL de etanol (95%) durante 30 minutos em banho ultrassônico. Após esse período o extrato foi filtrado e secado em rota- evaporador e posteriormente liofilizado. O rendimento obtido foi de 10% m:m.

Os compostos fenólicos totais e os flavonoides foram avaliados empregando o método descrito por Djeridane et al. (2006). A quantificação dos alcaloides totais foi determinada de acordo com o procedimento desenvolvido por Oliveira et al. (2006), utilizando menores volumes/massas de extrato e reagentes, porém mantendo as concentrações.

A avaliação da atividade “sequestradora” de radicais livres foi determinada pelo método fotolorimétrico in vitro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A cada 100 µL da amostra (extrato) foram adicionados 3000 µL da solução de DPPH 0,004% e incubada na temperatura ambiente por 30 minutos. O método consistiu no monitoramento do consumo do radical livre DPPH das amostras, através do decréscimo da medida de absorbância realizada em espectrofotômetro a 517 nm. A atividade foi calculada pela fórmula: % redução DPPH= (Abs branco – Abs amostra) / Abs branco x 100, onde Abs é a absorbância.

### **Análise estatística**

Para cada espécie, os dados foram testados quanto às premissas de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnoff;  $\alpha = 0,05$ ) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene,  $\alpha = 0,05$ ). As médias foram submetidas à ANOVA fatorial e havendo significância as médias de tempo de experimento e capacidades de retenção de água no solo foram comparadas pelo teste de Tukey e as médias da interação entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ).

## Resultados

### Plantas sobreviventes

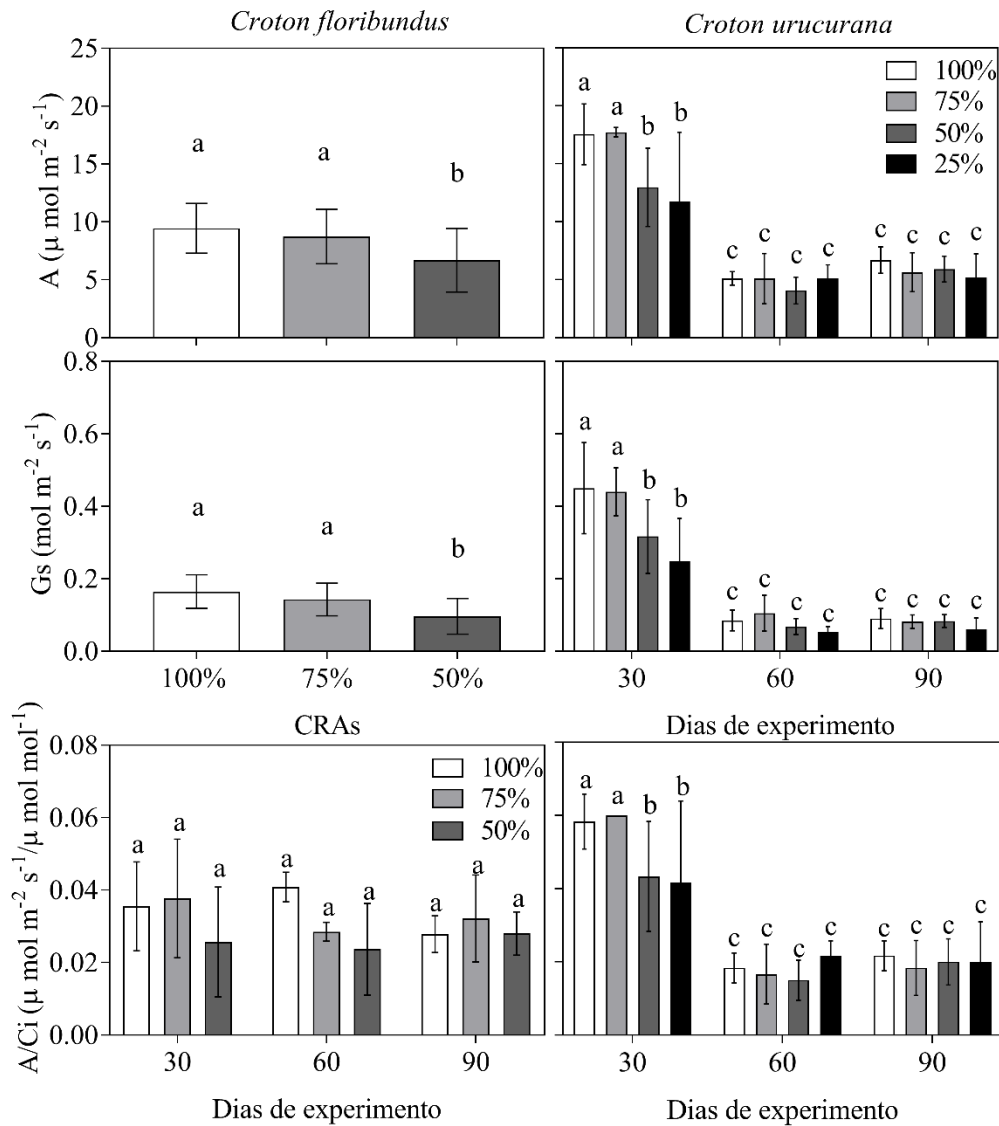
Todas as plantas de *C. floribundus* do tratamento de 25% da capacidade de retenção de água no solo (CRAs) morreram antes de completarem 30 dias. Cerca de 20% das plantas de *C. urucurana* cultivadas sob 25% de CRAs morreram. Nos demais tratamentos todas as plantas, das duas espécies, sobreviveram ao longo do experimento.

### Parâmetros fotossintéticos

Para *C. floribundus*, a taxa de absorção de CO<sub>2</sub> (*A*) e a condutância estomática (*G<sub>s</sub>*) foram influenciadas apenas pela CRAs. Já para as plantas de *C. urucurana*, *A*, *G<sub>s</sub>* e *A/C<sub>i</sub>* foram influenciadas por ambos os fatores analisados bem como pela interação entre eles (Material Suplementar Tabela S1).

Para *C. floribundus* houve decréscimo de *A* e *G<sub>s</sub>* apenas no tratamento de 50% da CRAs. Contudo, a disponibilidade de água no solo não afetou a eficiência da carboxilação da Rubisco (*A/C<sub>i</sub>*) (Figura 1). Em *C. urucurana*, observou-se redução de *A*, *G<sub>s</sub>* e *A/C<sub>i</sub>* nos tratamentos de 25 e 50% de CRAs com 30 dias de experimento. Nas avaliações realizadas com 60 e 90 dias, houve queda acentuada da *A*, *G<sub>s</sub>* e *A/C<sub>i</sub>* de plantas cultivadas em todos os tratamentos de CRAs, sem diferenças entre si (Figura 1).

Em ambas as espécies, os valores da eficiência fotoquímica do fotossistema II (*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*) foram influenciados pelo tempo de experimento e pela interação entre esse fator e a capacidade de retenção de água do solo (Material Suplementar Tabela S1), sem diferenças significativas entre os tratamentos de CRAs (dados não mostrados).

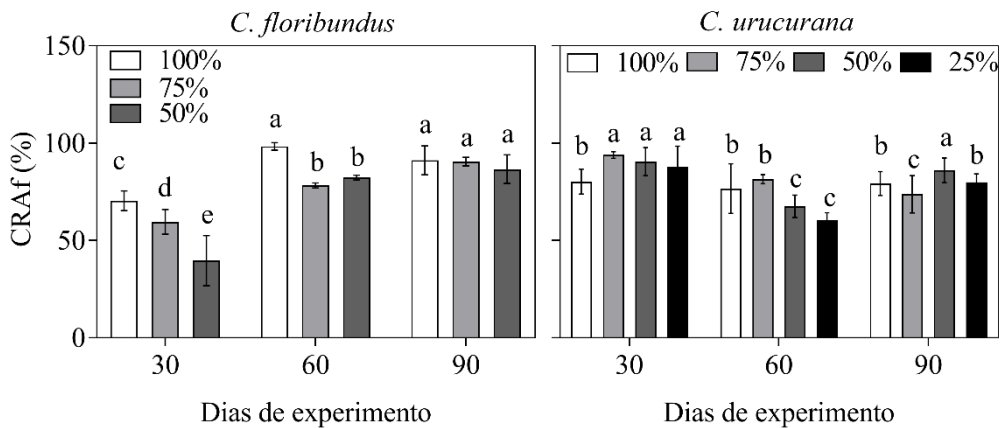


**Fig. 1** Efeito de diferentes capacidades de retenção de água do solo (CRAs) e do tempo de exposição a essas condições sobre a taxa de absorção de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), condutância estomática ( $G_s$ ) e eficiência da carboxilação da Rubisco ( $A/C_i$ ) para as duas espécies de *Croton*. Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ). Médias seguidas de mesma letra não variam entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

### Conteúdo relativo de água e de prolina nas folhas

Plantas de *C. floribundus* cultivadas por 30 e 60 dias com 50 e 75% de CRAs apresentaram um conteúdo relativo de água nas folhas ( $CRA_f$ ) menor que o das plantas sob

100% de CRAs. Já as plantas cultivadas por 90 dias não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 2). Para *C. urucurana* observou-se manutenção do *CRAf* nas plantas cultivadas a 100% de CRAs ao longo do experimento. Entretanto, houve redução do *CRAf* aos 60 dias com 50 e 25% de CRAs, com recuperação desses valores aos 90 dias (Figura 2).



**Fig. 2** Influência de diferentes capacidades de retenção de água do solo e tempo de experimento sobre o conteúdo relativo de água nas folhas (*CRAf*), mensurado às 5h da manhã, de duas espécies de *Croton*. Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão (n=6). Médias seguidas de mesma letra não variam entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Houve aumento significativo de prolina aos 90 dias no tratamento de 50% de CRAs em *C. floribundus* e no tratamento de 25% de CRAs em *C. urucurana* (dados não mostrados).

### Parâmetros de crescimento

Para ambas as espécies, todos os parâmetros de crescimento foram influenciados pela CRAs, pelo tempo de experimento, bem como pela interação entre esses fatores, com exceção dos dados de comprimento de raiz que foram influenciados pelos fatores isolados (Material Suplementar Tabela S2).

Houve incremento de massa seca da parte aérea nas plantas de *C. floribundus* em todos os tratamentos ao longo do tempo, com exceção das plantas sob 50% de CRAs, as quais apresentaram massa 89% menor em relação às plantas sob 100% de CRAs, aos 90 dias. Observou-se também que a massa seca da parte aérea foi menor a 75% de CRAs em relação às plantas sob 100% de CRAs (Figura 3). Para plantas de *C. urucurana*, também houve incremento da biomassa da parte aérea nos tratamentos ao longo do tempo, com exceção daquelas cultivadas sob 25% de CRAs. Nessa condição, sua biomassa foi 87% menor quando comparada às plantas sob 100% de CRAs, ao término do experimento (Figura 3).

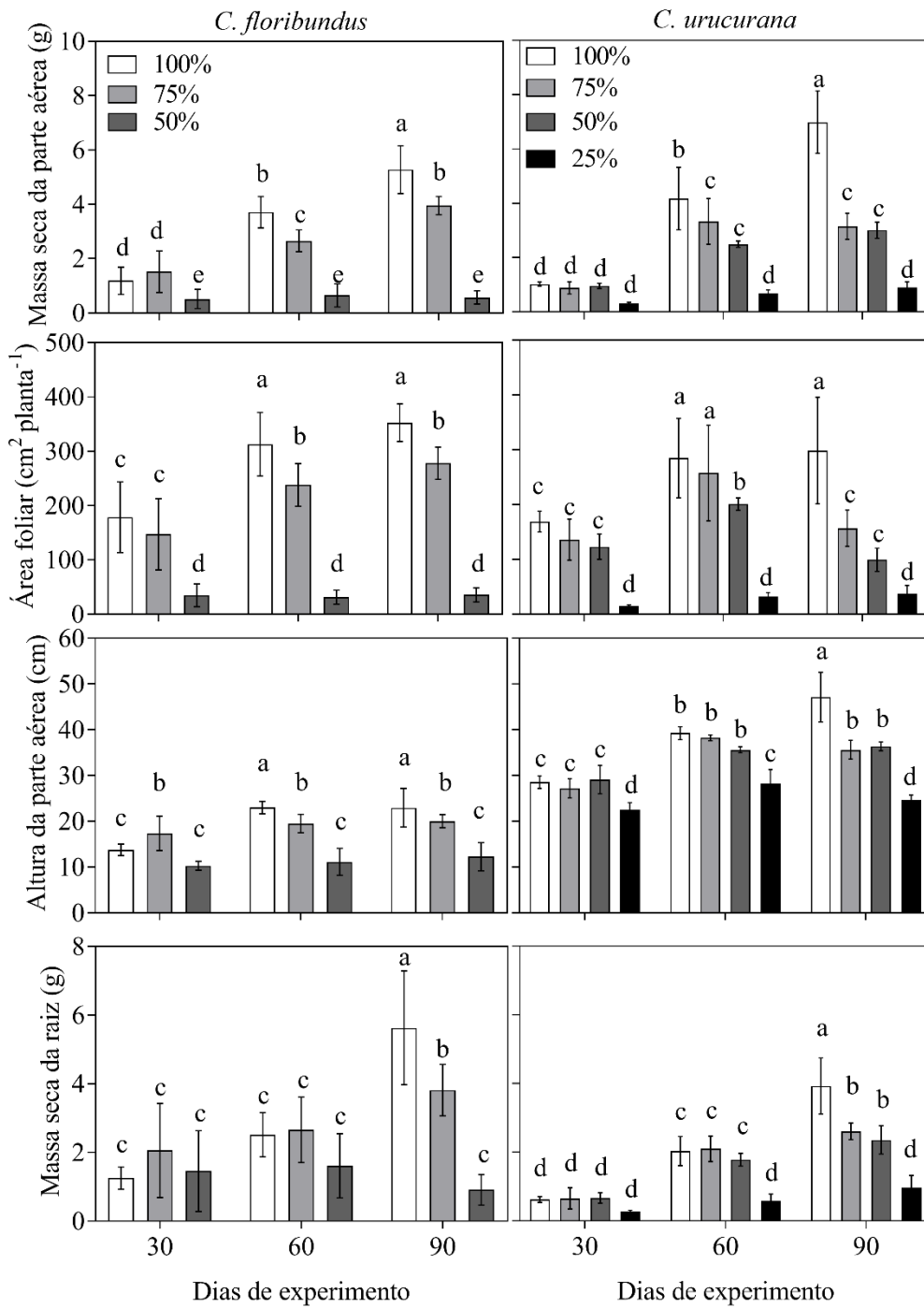
De maneira semelhante à massa seca da parte aérea, a área foliar das plantas de *C. floribundus* também aumentou ao longo do tempo, com exceção das plantas sob 50% de CRAs; e para plantas sob 75% de CRAs houve redução da área foliar em relação à 100% de CRAs a partir dos 60 dias de experimento (Figura 3). Para *C. urucurana*, também houve incremento da área foliar ao longo do tempo, exceto nas mudas sob 25% de CRAs. Adicionalmente, houve redução da área foliar a 50% e 75% de CRAs aos 60 e 90 dias de experimento, respectivamente, em relação às plantas sob 100% CRAs (Figura 3).

A altura da parte aérea de *C. floribundus* aumentou apenas sob 100% de CRAs, permanecendo no mesmo valor para os demais tratamentos ao longo dos 90 dias de experimento (Figura 3). A altura da parte aérea de plantas de *C. urucurana* sob 100% de CRAs aumentou ao longo dos 90 dias de avaliação, enquanto plantas sob 75 e 50% de CRAs apresentaram aumento de altura até os 60 dias, permanecendo com a mesma altura até chegar aos 90 dias. Para as plantas sob 25% de CRAs não houve crescimento em altura, exceto para o tratamento de 60 dias (Figura 3).

Para as plantas de *C. floribundus*, houve aumento significativo de massa seca da raiz nos tratamentos de 100 e 75% de CRAs aos 90 dias. Plantas sob 50% de CRAs não tiveram aumento de massa de raiz ao longo do tempo, apresentando massa 84% menor, em relação às

plantas sob 100% de CRAs, ao término do experimento (Figura 3). Já para *C. urucurana*, a massa seca da raiz aumentou nas plantas cultivadas em todos os tratamentos, ao longo do tempo, com exceção das plantas sob 25% de CRAs. Além disso, a biomassa da raiz em 75 e 50% de CRAs foi 33% e 40% menor, respectivamente, em relação às plantas sob 100% CRAs, ao término do experimento (Figura 3).

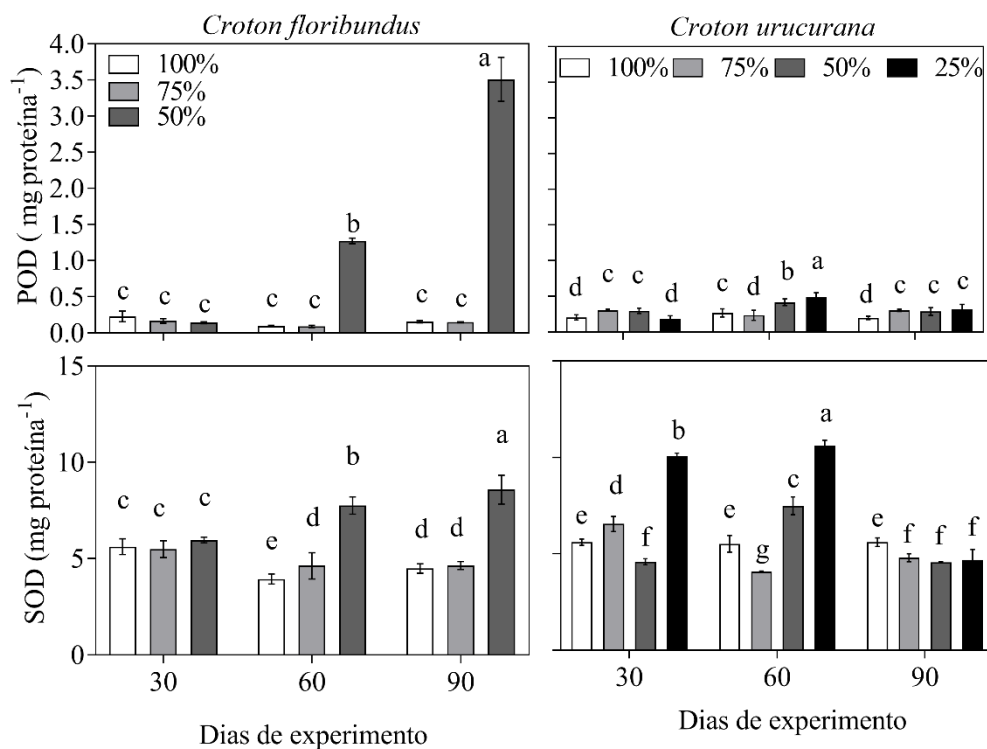
O comprimento da raiz aumentou significativamente aos 90 dias para as plantas de *C. floribundus*, enquanto que para as plantas de *C. urucurana* esse aumento ocorreu aos 60 dias, não diferindo aos 90 dias (dados não mostrados). Adicionalmente, o tratamento de 50% de CRAs reduziu o crescimento das raízes das plantas de *C. floribundus*, enquanto que para as plantas de *C. urucurana* essa redução ocorreu apenas no tratamento de 25% de CRAs (dados não mostrados).



**Fig. 3** Alterações no crescimento de duas espécies de *Croton* submetidas a diferentes capacidades de retenção de água do solo e tempo de experimento. Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão (n=4). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

### Atividade enzimática

As plantas de *C. floribundus* sob 50% de CRAs apresentaram aumento da enzima POD e SOD a partir dos 60 dias (Figura 4). Em *C. urucurana* houve aumento da POD aos 60 dias sob 50 e 25% de CRAs seguido de redução aos 90 dias. Houve também aumento significativo da SOD aos 30 e 60 dias sob 25% de CRAs, e aos 60 dias sob 50% de CRAs, também seguido de redução significativa aos 90 dias (Figura 4).



**Fig. 4** Influência de diferentes capacidades de retenção de água do solo e tempo de experimento sobre as enzimas guaiacol peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), em folhas de duas espécies de *Croton*. Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão (n=4). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

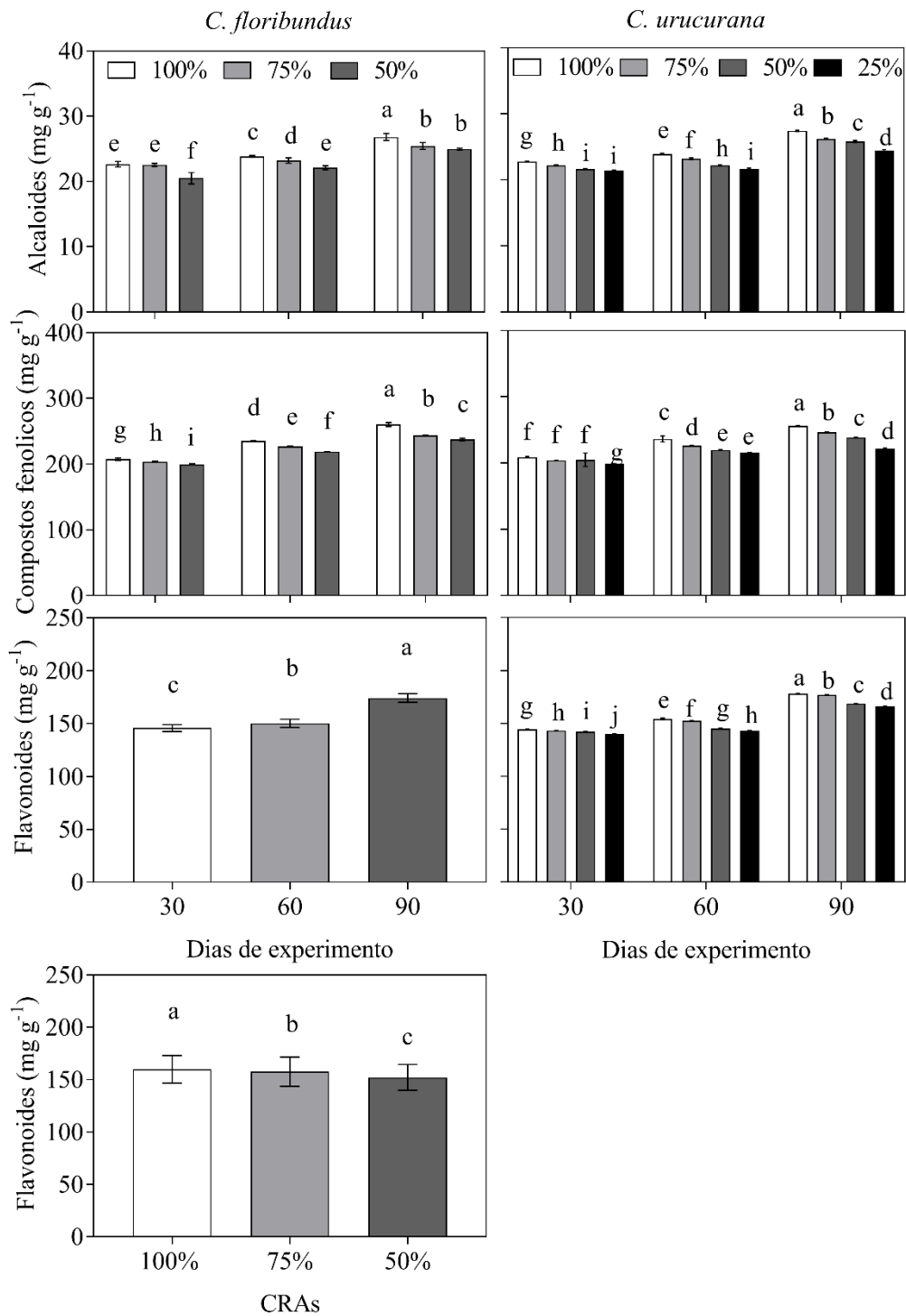
### **Compostos do metabolismo secundário e atividade antioxidante**

Para ambas as espécies, compostos fenólicos e alcaloides foram influenciados pela CRAs e pelo tempo de experimento, bem como pela interação entre esses fatores. Já os flavonoides e atividade antioxidante foram influenciados pelos fatores isolados em *C. floribundus*, e pelos fatores isolados, bem como sua interação em *C. urucurana* (Material Suplementar Tabela S3).

Em *C. floribundus* a quantidade de alcaloides reduziu nas plantas cultivadas sob 50% de CRAs aos 30 dias, sendo que aos 60 e 90 dias houve diminuição nos tratamentos de 75 e 50% de CRAs. Contudo, quando comparados cada tratamento ao longo do tempo, houve aumento gradativo de alcaloides (Figura 5). Em *C. urucurana* a quantidade de alcaloides diminuiu em todos os tratamentos de CRAs quando comparado às plantas sob 100% CRAs ao longo do tempo, sendo as maiores quantidades observadas aos 90 dias (Figura 5).

O déficit hídrico diminuiu a quantidade de compostos fenólicos presente nas folhas de *C. floribundus*, entretanto houve incremento em todos os tratamentos de CRAs ao longo do tempo (Figura 5). Em *C. urucurana* houve diminuição de compostos fenólicos nas plantas cultivadas sob 25% de CRAs aos 30 dias quando comparado às plantas sob 100%, e aos 60 e 90 dias houve diminuição conforme reduziu a CRAs (Figura 5).

A quantidade de flavonoides (Figura 5) e a atividade antioxidante (dados não mostrados) aumentaram ao longo do tempo de avaliação nas plantas de *C. floribundus*. Entretanto, houve diminuição dos flavonoides e da atividade antioxidante conforme reduziu a quantidade de água no solo. Em *C. urucurana* houve diminuição de flavonoides (Figura 5) e da atividade antioxidante (dados não mostrados) conforme reduziu a CRAs, ao longo do tempo, sendo a maior quantidade de flavonoides e da atividade antioxidante observada aos 90 dias sob 100% de CRAs (Figura 5).



**Fig. 5** Alterações nos compostos do metabolismo secundário em folhas de duas espécies de *Croton* submetidas a diferentes capacidades de retenção de água do solo (CRAs) e tempo de experimento. Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

## Discussão

Nosso interesse maior com esse estudo foi o de avaliar as respostas metabólicas das duas espécies de *Croton*, frente ao déficit hídrico, por um longo período, a fim de relacioná-las com suas capacidades de tolerância e de crescer sob esse estresse.

Com relação às respostas do metabolismo primário, o decréscimo da assimilação de carbono em ambas as espécies de *Croton* cultivadas em solos com 50% de CRAs ou menos, deve estar associado à limitação estomática, sendo esta uma resposta comumente observada em plantas cultivadas em solos com baixa disponibilidade hídrica, como forma de reduzir a perda de água por transpiração (Menezes-Silva et al. 2019; Schimpl et al. 2019).

Para plantas de *C. urucurana* sob 100% de CRAs aos 60 e 90 dias houve drástica redução de *A* e *Gs* em relação às plantas sob 100% de CRAs aos 30 dias. Essa redução de *A* e *Gs* deve ser a responsável pela ausência de diferenças significativas para estes parâmetros entre plantas cultivadas com maior e menor disponibilidade de água no solo aos 60 e 90 dias. Neste cenário, a ausência de diferenças de *A* e *Gs* entre os tratamentos não deve ser entendida como aclimação das plantas a menor disponibilidade de água, já que dados de redução de crescimento apontam em direção oposta, ou seja, que houve comprometimento das trocas gasosas nos tratamentos com menor CRAs. A redução de *A* e *Gs* em plantas sob 100% de CRAs pode estar relacionada às condições climáticas, temperaturas mais amenas (24 e 22°C) e baixa umidade relativa do ar (41 e 40%) aos 60 e 90 dias de avaliação, respectivamente, em comparação com as condições climáticas aos 30 dias de experimento (29°C e 60% de umidade relativa do ar), de qualquer modo, a redução de *A* no controle não implicou em redução do crescimento. Temperaturas amenas e ar seco são fatores relacionados com menor abertura estomática e conseqüentemente menor assimilação de carbono (Menezes-Silva et al. 2019). Essas condições de clima também reduziram a atividade de carboxilação da Rubisco (*A/Ci*) em plantas de *C. urucurana* sob 100% de CRAs com 60 e 90 dias de experimento. Temperaturas

mais baixas limitam a capacidade de regeneração da Rubisco, reduzindo a eficiência de carboxilação do Ciclo de Calvin (Yamori et al. 2010; Crafts-Brandner e Salvucci 2000).

Os valores de  $F_v/F_m$  não foram alterados pelos tratamentos em ambas as espécies, indicando que o aparelho fotossintético não foi afetado pelo déficit hídrico. Provavelmente o aparelho fotossintético não foi afetado pela baixa disponibilidade hídrica no solo porque houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes POD e SOD, que atuam contra a presença de radicais livres, mantendo as funções metabólicas das plantas (Búfalo et al., 2016). Além das enzimas antioxidantes, ambas as espécies apresentaram flavonoides com atividade antioxidante, que podem ter atuado na eliminação das EROs e na redução do dano oxidativo (Agati et al. 2020; Fàbregas e Fernie 2019). Assim, é mais razoável explicar a queda de A por valores baixos de Gs do que por reduções no desempenho fotoquímico (Kissmann et al. 2014).

Quanto ao conteúdo relativo de água nas folhas, não ocorreu recuperação dos valores em função de menor CRAs para plantas de *C. floribundus*, com 30 e 60 dias de cultivo, e para plantas de *C. urucurana* com 60 dias de cultivo. Porém, ambas as espécies foram capazes de recuperar seu estado hídrico aos 90 dias, o que pode estar relacionado com o aumento significativo de prolina nas folhas. Segundo Kudoyarova et al. (2013), plantas em condições de déficit hídrico possuem mecanismos de ajuste osmótico para manter o conteúdo de água nos tecidos, sendo que um destes mecanismos envolve a produção de prolina (Lin et al. 2019; Martínez et al. 2018).

O ganho de biomassa aérea para ambas as espécies foi limitado sob menores disponibilidades hídricas no solo. Nestas condições, a redução de massa aérea se deu por conta da menor altura do caule e da menor área foliar. A redução de massa aérea sob menores disponibilidades hídricas, uma resposta comum em plantas (Braghiere et al. 2020; Jia et al. 2019), esteve relacionada à diminuição da condutância estomática e da assimilação de carbono no mesmo período. Adicionalmente, plantas sob déficit hídrico tendem a aumentar a produção

de hormônios como o ácido abscísico (ABA), o que leva ao fechamento estomático, menor fotossíntese e, portanto, a um menor crescimento das plantas (Brunetti et al. 2019; Zegada-Lizarazu e Monti 2019; McKiernan et al. 2017).

Embora o crescimento da raiz tenha sido afetado pelo déficit hídrico em ambas as espécies, as plantas de *C. floribundus* demonstraram ser mais sensíveis ao déficit hídrico, pois o comprimento da raiz e sua massa seca foram menores sob 50% CRAs, sendo a redução de massa na ordem de 84% em relação a plantas sob 100% de CRAs. Já para *C. urucurana*, não houve redução significativa do comprimento da raiz, e a redução da massa seca neste órgão foi de apenas 40% em relação ao cultivo sob 100% de CRAs. A limitação do crescimento da raiz é comum sob déficit hídrico (Delfin et al. 2021; Merchant et al. 2007), sendo que uma raiz menos desenvolvida pode diminuir a quantidade de água absorvida, já que pode haver uma limitação na área explorada do solo. Essa resposta também pode estar relacionada com o comprometimento do desenvolvimento da parte aérea observado para as duas espécies de *Croton*.

O aumento da atividade das enzimas POD e SOD sob déficit hídrico demonstra que essas espécies possuem mecanismos de proteção contra a presença de radicais livres (Búfalo et al. 2016). Favaretto et al. (2011) observaram aumento da atividade de SOD em algumas espécies pioneiras sob condições de pleno sol. Os autores sugerem que plantas pioneiras, como *C. floribundus* e *C. urucurana* têm maior tolerância ao dano foto-oxidativo, associada à maior atividade de SOD.

Levando em conta a sobrevivência e o crescimento, *C. floribundus* mostrou-se mais sensível ao déficit hídrico do que *C. urucurana*, já que as plantas não se desenvolveram a 50% e morreram sob 25% CRAs. Entretanto, as temperaturas durante o período de experimento com *C. floribundus* estavam mais elevadas do que durante o período com *C. urucurana*. Por isso, comparações devem ser feitas com certa cautela, pois temperaturas mais elevadas podem

influenciar negativamente o metabolismo das plantas sob estresse hídrico. Embora o estudo desenvolvido por Rodrigues et al. (2019), com essas mesmas espécies em locais de restauração durante a estação seca, e, portanto, sob temperaturas mais amenas, também apontou que *C. floribundus* é mais sensível do que *C. urucurana*.

Em relação aos compostos do metabolismo secundário, a quantidade de compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides diminuiu em ambas as espécies, sob déficit hídrico, provavelmente porque houve alteração no metabolismo primário em situação de estresse hídrico, influenciando o metabolismo secundário (Salisbury e Ross 1991). A atividade antioxidante diminuiu, possivelmente, devido à queda dos flavonoides, pois alguns autores sugerem que a atividade antioxidante das plantas está relacionada à presença de compostos fenólicos, como flavonoides e taninos (Marinho et al. 2020; Khater et al. 2019). Embora o déficit hídrico tenha diminuído esses compostos secundários e a atividade antioxidante, a queda não foi brusca e eles aumentaram com o tempo. Esse incremento pode estar relacionado com a idade e o desenvolvimento das plantas (Borges et al. 2017; Sampaio et al. 2016).

## **Conclusão**

Nosso estudo evidenciou que em plantas jovens de *C. floribundus* e *C. urucurana* submetidas ao déficit hídrico, ocorrem significativas modificações nos processos fisiológicos com alterações na produção de compostos secundários.

As mudanças metabólicas, quando favoráveis, colaboram para a tolerância a determinada intensidade de estresse, por exemplo, ambas as espécies são capazes de sobreviver ao déficit hídrico moderado (50% de CRAs), porém, *C. floribundus* mostrou-se mais sensível do que *C. urucurana*, já que as plantas não se desenvolveram a 50% e morreram sob 25% de CRAs.

Para as espécies congêneras estudadas, as modificações do metabolismo enzimático representadas pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes, bem como a produção de moléculas protetoras como a prolina, sugerem respostas com valor adaptativo em resposta ao déficit hídrico. Por outro lado, o déficit hídrico altera não só o metabolismo primário das espécies, mas também a produção de compostos do metabolismo secundário, com redução de alcaloides, compostos fenólicos e flavonoides.

## Referências

- Agati G, Brunetti C, Fini A, Gori A, Guidi L, Landi M, Sebastiani F, Tattini M (2020) Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation. *Antioxidants* 9:1-18. <https://doi.org/10.3390/antiox9111098>
- Amaral GC, Pezzopane JEM, de Souza Nôia Júnior R, Fonseca MDS, Toledo JV, Xavier TMT, Oliveira BS, Martínez MF, da Costa Jerônimo Júnior RA, Gonçalves EO (2021) Ecophysiology of *Pilocarpus microphyllus* in response to temperature, water availability and vapour pressure deficit. *Trees* 35:543–555. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-02055-x>
- Barbieri DSV, Tonial F, Lopez PA, Maia BHLN, Santos GD, Ribas MO, Glienke C, Vicente VA (2014) Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology* 59:887–896. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.05.006>
- Barrs HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15:413–428. <https://doi.org/10.1071/BI9620413>
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

- Borges CV, Minatel IO, Gomez-Gomez HA, Lima GPP (2017) Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites. In: Ghorbanpour M., Varma A. (eds) Medicinal Plants and Environmental Challenges. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_15)
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Braghiere RK, Gérard F, Evers JB, Pradal C, Pagès L (2020) Simulating the effects of water limitation on plant biomass using a 3D functional–structural plant model of shoot and root driven by soil hydraulics. *Annals of Botany* 126:713-728. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa059>
- Brunetti C, Gori A, Marino G, Latini P, Sobolev AP, Nardini A, Haworth M, Giovannelli A, Capitani D, Loreto F (2019) Dynamic changes in ABA content in water-stressed *Populus nigra*: effects on carbon fixation and soluble carbohydrates. *Annals of Botany* 124:627–643. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz005>
- Búfalo J, Rodrigues TM, Almeida LFR, Tozin LRS, Marques MOM, Boaro CSF (2016) PEG-induced osmotic stress in *Mentha x piperita* L.: structural features and metabolic responses. *Plant Physiology and Biochemistry* 105:174–184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.009>
- Candan N, Tarhan L (2012) Tolerance or sensitivity responses of *Mentha pulegium* to osmotic and water logging stress in terms of antioxidant defense systems and membrane lipid peroxidation. *Environmental Experimental Botany* 75:83-88. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.08.014>
- Cordeiro I, Secco R, Carneiro-Torres DS, Lima LR, De Caruzo MBR, Berry P, Riina R, Silva OLM, Silva MJ, Sodr e RC (2015). *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim

Botânico do Rio de Janeiro.

Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17546>>.

- Cordeiro KW, Felipe JL, Malange KF, Prado PR, Figueiredo PO, Garcez FR, Freitas KC (2016) Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. Journal of Ethnopharmacology 183:128–13. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.051>
- Crafts-Brandner SJ, Law RD (2000) Effect of heat stress on the inhibition and recovery of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state. Planta 212:67–74. <https://doi.org/10.1007/s004250000364>
- Delfin EF, Drobnitch ST, Comas LH (2021) Plant strategies for maximizing growth during water stress and subsequent recovery in *Solanum melongena* L. (eggplant). Plos One 16(9):e0256342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256342>
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry 97:654-660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Durigan G, Figliolia MB, Kawabata M, Garrido MAO, Baitello JB. Sementes e mudas de árvores tropicais. 2. ed. São Paulo: Instituto Florestal, 2002. 65 p.
- Fàbregas N, Fernie AR (2019) The metabolic response to drought. Journal of Experimental Botany 70:1077–1085. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery437>
- Favaretto VF, Martinez CA, Soriani HH, Furriel RPM (2011) Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. Environmental and Experimental Botany 70:20–28. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.06.003>
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I- Occurrence in higher plants. Physiologia Plantarum 59:309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>

- Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30(2):374. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- Gururani MA, Venkatesh J, Tran LS (2015) Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular Plant* 8:1304–1320. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>
- Hammerschmidt R, Nuckles EM, Kuc J (1982) Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology* 20:73-82. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(82\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0048-4059(82)90025-X)
- Horner JD (1990) Nonlinear effects of water deficits on foliar tannin concentration. *Biochemistry* 18:211-213. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(90\)90062-K](https://doi.org/10.1016/0305-1978(90)90062-K)
- IPCC, 2021: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S. L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M. I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T. K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu and B. Zhou (eds.)]. Cambridge University Press. In Press.
- Jia H, Wang L, Li J, Sun P, Lu M, Hu J (2019) Physiological and metabolic responses of *Salix sinopurpurea* and *Salix suchowensis* to drought stress. *Trees* 34:563-577. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01937-z>
- Khater M, Ravishankar D, Greco F, Osborn HM (2019) Metal complexes of flavonoids: their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities. *Future Medicinal Chemistry* 11(21):2845-2867. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc-2019-0237>
- Kishor PBK, Sangam S, Amrutha RN, Laxmi OS, Naidu KR, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation,

uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88:424-438.

Kissmann C, Veiga EB, Eichemberg MT, Habermann G (2014) Morphological effects of flooding on *Styrax pohlii* and the dynamics of physiological responses during flooding and post-flooding conditions. *Aquatic Botany* 119:7-14. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2014.06.007>

Kudoyarova GR, Klolodova VP, Veselov DS (2013) Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. *Journal Plant Physiology* 60:165-175. <https://doi.org/10.1134/S1021443713020143>

Lin J, Zhang R, Hu Y, Song Y, Hänninen H, Wu J (2019) Interactive effects of drought and shading on *Torreya grandis* seedlings: physiological and growth responses. *Trees* 33:951–961. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01831-8>

Luchi AE (2004) Anatomia do lenho de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) de solos com diferentes níveis de umidade. *Acta Botânica Brasilica* 27:271–280. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000200007>

Marinho TA, Oliveira MG, Menezes-Filho ACP, Castro CFS, Oliveira IMM, Borges LL, Melo-Reis PR, Silva-Jr NJ (2020) Phytochemical characterization, and antioxidant and antibacterial activities of the hydroethanolic extract of *Anadenanthera peregrina* stem bark. *Brazilian Journal of Biology* 82:1-12. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234476>

Martínez LM, Fernández-Ocaña A, Rey PJ, Salido T, Amil-Ruiz F, Manzaneda AJ (2018) Variation in functional responses to water stress and differentiation between natural allopolyploid populations in the *Brachypodium distachyon* species complex. *Annals of Botany* 121:1369–1382. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy037>

McKiernan AB, Potts BM, Hovenden MJ, Brodribb TJ, Davies NW, Rodemann T, McAdam SAM, O'Reilly-Wapstra JM (2017) A water availability gradient reveals the deficit level

- required to affect traits in potted juvenile *Eucalyptus globulus*. *Annals of Botany* 119(6):1043–1052. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw266>
- Menezes-Silva PE, Loram-Lourenço L, Alves RDFB, Sousa LF, Almeida SES, Farnese FS (2019) Different ways to die in a changing world: Consequences of climate change for tree species performance and survival through an ecophysiological perspective. *Ecology and Evolution* 9:11979–11999. <https://doi.org/10.1002/ece3.5663>
- Merchant A, Callister A, Arndt S, Tausz M, Adams M (2007) Contrasting physiological responses of six *Eucalyptus* species to water deficit. *Annals of Botany* 100:1507–1515. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm234>
- Oliveira IS, Lima JCS, Silva RM, Martins DTO (2008) Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18:587–593. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400016>
- Oliveira MAC, Albuquerque MM, Xavier HS, Strattmann RR, Júnior SG, Queiroz AT (2006) Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de alcaloides totais como berberina em fitoterápico contendo *Berberis vulgaris* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16:357–364. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300013>
- Padilha NS, Silva CJ, Pereira SB, Silva JAN, Heid DM, Bottega SP, Scalon SPQ (2016) Crescimento inicial do pinhão-manso submetido a diferentes regimes hídricos em Latossolo Vermelho Distrófico. *Ciência Florestal* 26(2):513–521. <https://doi.org/10.5902/1980509822752>
- Ramírez-Valiente JA, Sánchez-Gómez D, Aranda I, Valladares F (2010) Phenotypic plasticity and local adaptation in leaf ecophysiological traits of 13 contrasting cork oak populations under different water availabilities. *Tree Physiology* 30:618–627. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq013>

- Ramos VS, Durigan G, Franco GADC, Siqueira MF, Rodrigues RR *Árvores da Floresta Estacional Semidecidual: guia de identificação de espécies*. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 2008. v. 1, 312 p.
- Rodrigues AL, Bertholdi AAS, Mantoan LPB, Vasconcellos GM, Almeida LFR (2019) Photochemistry and hydric responses of congeneric *Croton* species at restoration sites under dry season: implications for species selection. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 31:329–339. <https://doi.org/10.1007/s40626-019-00149-7>
- Salatino A, Salatino MLF, Negri G (2007) Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18(1):11-33. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>
- Salisbury FB, Ross CW (1991) *Plant physiology*. 4th Edition, Wadsworth Publishing Company, Beverly, 481.
- Sampaio B, Edrada-Ebel R, Da Costa, F (2016) Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Scientific Reports* 6:1-11. <https://doi.org/10.1038/srep29265>
- Sasani N, Pâques LE, Boulanger G, Singh AP, Gierlinger N, Rosner S, Brendel O (2021) Physiological and anatomical responses to drought stress differ between two larch species and their hybrid. *Trees* 35:1467–1484. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02129-4>
- Schäfer KVR (2011) Canopy stomatal conductance following drought, disturbance, and death in an upland oak/pine forest of the New Jersey Pine Barrens, USA. *Front Plant Science* 2:15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00015>
- Schimp FC, Ferreira MJ, Jaquetti RK, Martins SCV, Goncalves JFC (2019) Physiological responses of Young Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) plants to drought stress and subsequent rewatering. *Flora* 252:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.02.001>

- Selmar D, Kleinwächter M (2013) Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products* 42:558-566. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.020>
- Silvestrini M, Pinto-Maglio CAF, Zucchi MI, Santos FAM (2013) Cytogenetics and characterization of microsatellite loci for a South American pioneer tree species, *Croton floribundus*. *Genome* 56:743–751. <https://doi.org/10.1139/gen-2013-0159>
- Souza CC, Oliveira FA, Silva IF, Amorim Neto MS (2000) Recuperação de métodos de determinação de água disponível e manejo da irrigação em terra roxa sob cultivo de algodoeiro herbáceo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 4(3):338-342. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662000000300006>
- Szabados L, Savouré A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15:0–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
- Uchôa PKS, Silva Jr JN, Silveira ER, Lima MAS (2013) Trachylobane and kaurane diterpenes from *Croton floribundus* Spreng. *Química Nova* 36(6):778-782. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600006>
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids* 35:753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- Yamori W, Noguchi K, Hikosaka K, Terashima I (2010) Phenotypic plasticity in photosynthetic temperature acclimation among crop species with different cold tolerances. *Plant Physiology* 152:388–399. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145862>
- Zegada-Lizarazu W, Monti A (2019) Deep root growth, ABA adjustments and root water uptake response to soil water deficit in giant reed. *Annals of Botany* 124:605–615. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz001>

Zhang S, Li Q, Ma K, Chen L (2001) Temperature dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO<sub>2</sub> assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday higher irradiance. *Photosynthetica* 39:383-388. <https://doi.org/10.1023/A:1015130326683>

### Material suplementar

Tabela 1 – Resultados da Anova dois fatores para os efeitos da capacidade de retenção de água do solo (CRAs), tempo de tratamento (T) e sua interação (CRAs x T) sobre parâmetros fisiológicos foliares das duas espécies de *Croton* avaliadas. A/Ci: eficiência imediata da carboxilação da Rubisco, Fv/Fm: eficiência fotoquímica do fotossistema II, CRA foliar: capacidade de retenção de água foliar.

Parâmetros	<i>C. floribundus</i>		<i>C. urucurana</i>	
	F	p	F	p
Taxa de absorção de CO <sub>2</sub>				
CRAs	6,368	0,0165	4,046	0,0271
T	0,081	0,9228	141,950	<0,0001
CRAs x T	1,020	0,4131	3,190	0,0118
Condutância estomática				
CRAs	7,325	0,0110	6,201	0,0059
T	0,667	0,5207	162,385	<0,0001
CRAs x T	0,926	0,4619	3,505	0,0070
A/Ci				
CRAs	3,065	0,0916	1,277	0,3181
T	0,608	0,5511	107,527	<0,0001
CRAs x T	1,826	0,1498	2,912	0,0188
Fv/Fm				
CRAs	2,177	0,1946	0,203	0,8927
T	3,939	0,0381	4,282	0,0206
CRAs x T	5,169	0,0060	2,355	0,0484
CRA foliar				
CRAs	75,241	0,0001	2,012	0,1829
T	80,074	<0,0001	21,132	<0,0001
CRAs x T	5,606	0,0041	4,561	0,0032
Prolina				
CRAs	48,620	0,0002	58,665	0,0000
T	22,578	0,0000	148,201	0,0000

Parâmetros	<i>C. floribundus</i>		<i>C. urucurana</i>	
	F	p	F	p
CRA's x T	32,578	0,0000	16,833	0,0000

Tabela 2 – Resultados da Anova dois fatores para os efeitos da capacidade de retenção de água do solo (CRAs), tempo de tratamento (T) e sua interação (CRAs x T) sobre parâmetros de crescimento das duas espécies de *Croton* avaliadas.

Parâmetros	<i>C. floribundus</i>		<i>C. urucurana</i>	
	F	p	F	p
Massa seca da parte aérea				
CRAs	81,768	<0,0001	51,659	<0,0001
T	58,015	<0,0001	133,127	<0,0001
CRAs x T	16,758	<0,0001	24,270	<0,0001
Área foliar				
CRAs	174,531	<0,0001	45,355	<0,0001
T	14,972	0,0001	12,019	0,0002
CRAs x T	4,054	0,0162	3,069	0,0225
Altura da parte aérea				
CRAs	33,225	0,0006	70,064	<0,0001
T	11,116	0,0007	75,261	<0,0001
CRAs x T	3,558	0,0263	9,951	<0,0001
Massa seca da raiz				
CRAs	6,055	0,0364	27,014	0,0001
T	13,224	0,0003	139,120	<0,0001
CRAs x T	8,246	0,0006	12,190	<0,0001
Comprimento da raiz				
CRAs	27,913	0,0009	9,278	0,0041
T	5,895	0,0107	5,978	0,0078
CRAs x T	1,817	0,1696	0,937	0,4870

Tabela 3 – Resultados da Anova dois fatores para os efeitos da capacidade de retenção de água do solo (CRAs), tempo de tratamento (T) e sua interação (CRAs x T) sobre atividade enzimática, compostos do metabolismo secundário e atividade antioxidante das duas espécies de *Croton* avaliadas.

Parâmetros	<i>C. floribundus</i>		<i>C. urucurana</i>	
	F	p	F	p
<b>Peroxidase</b>				
CRAs	990,404	0,0000	1,837	0,2107
T	331,585	0,0000	43,754	0,0000
CRAs x T	347,673	0,0000	24,539	0,0000
<b>Superóxido dismutase</b>				
CRAs	466,632	0,0000	62,195	0,0000
T	3,964	0,0375	78,680	0,0000
CRAs x T	32,334	0,0000	51,758	0,0000
<b>Fenois</b>				
CRAs	736,946	0,0000	91,607	0,0000
T	2322,058	0,0000	493,658	0,0000
CRAs x T	26,581	0,0000	11,272	0,0000
<b>Alcaloides</b>				
CRAs	723,251	0,0000	593,799	0,0000
T	213,945	0,0000	6352,241	0,0000
CRAs x T	3,223	0,0368	46,389	0,0000
<b>Flavonoides</b>				
CRAs	167,872	0,0000	2227,819	0,0000
T	1046,516	0,0000	49445,760	0,0000
CRAs x T	2,398	0,0883	245,169	0,0000
<b>Atividade antioxidante</b>				
CRAs	54,963	0,0001	5390,188	0,0000
T	1470,376	0,0000	22412,461	0,0000
CRAs x T	0,675	0,6178	27,944	0,0000

## **CAPÍTULO 2: O alagamento afeta a sobrevivência e o metabolismo de duas espécies de *Croton*?<sup>1</sup>**

**Resumo** Espécies tropicais nativas com ampla distribuição estão sujeitas à heterogeneidade ambiental. *Croton floribundus* e *C. urucurana*, por exemplo, ocorrem em matas ciliares, floresta estacional semidecidual, entre outras formações florestais. Para elucidar possíveis estratégias adaptativas que permitem esse par congênico ocupar áreas sujeitas a alagamentos sazonais ou perenes, estudamos o efeito de diferentes tempos de exposição ao alagamento sobre sua sobrevivência e metabolismo, bem como o potencial de recuperação pós-alagamento. Diferentemente de *C. urucurana*, as plantas de *C. floribundus* sobreviveram ao alagamento apenas por 60 dias e ao pós-alagamento dos 60 dias, não sobrevivendo ao alagamento até os 90 dias. Em ambas as espécies, o alagamento reduziu a taxa de absorção de CO<sub>2</sub>, a condutância estomática, a eficiência de carboxilação da rubisco, a eficiência fotoquímica do fotossistema II e a biomassa da parte aérea e raiz, entretanto, houve recuperação desses parâmetros no pós-alagamento. Adicionalmente, o alagamento aumentou o teor de alcaloides, compostos fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante, prolina e a atividade das enzimas guaiacol peroxidase e superóxido dismutase. Em ambas as espécies não houve aumento da atividade da enzima álcool desidrogenase. Assim, concluímos que *C. floribundus* é mais sensível ao alagamento quando comparada ao seu par congênico, que os mecanismos de adaptação ao alagamento estão relacionados à plasticidade fenotípica das espécies, incluindo a formação de lenticelas caulinares e raízes adventícias, modificações do metabolismo primário e secundário e produção de moléculas protetoras como a prolina.

**Palavras-chave** *Croton floribundus*, *Croton urucurana*, Fotossíntese, Compostos fenólicos, Enzimas antioxidantes

<sup>1</sup> Esse artigo será submetido na revista Trees.

## **Introdução**

Como consequência das mudanças climáticas, há previsão de uma frequência maior de eventos climáticos extremos, como tempestades tropicais, inundações, ondas de calor, seca, entre outros (IPCC 2021). Esses distúrbios ambientais são típicos estressores abióticos para plantas (Bourtsoukidis et al. 2014; Copolovici e Niinemets 2010; Loreto e Schnitzler 2010), e o alagamento é um dos estresses abióticos mais comuns que limitam o crescimento e a sobrevivência de muitas plantas, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Kreuzwieser e Rennenberg, 2014). Assim, o estresse por alagamento pode ser mais severo e frequente com o agravamento das mudanças climáticas globais, e a tolerância a esse estresse depende da espécie, idade da planta, e outros fatores como tempo e duração das inundações (Voeselek e Bailey-Serres 2015; Kreuzwieser et al. 2004; Kozlowski 1997).

Em regiões inundadas, a água ocupa os espaços de ar do solo provocando a redução na disponibilidade de oxigênio para as células, como resultado da hipóxia, podem ser observadas alterações morfofisiológicas e bioquímicas nas plantas como a diminuição da respiração, fotossíntese, condutância estomática, eficiência de carboxilação da Rubisco (Barbosa et al. 2021; Cremon et al. 2020; Junglos et al. 2018), produção inadequada de ATP, aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a peroxidase (POD), aumento de prolina (Wu et al. 2022), limitação do crescimento das plantas (Barbosa et al. 2021; Kissman et al. 2014), diminuição da eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm) (Cremon et al. 2020; Liu et al. 2014), e produção de lenticelas hipertrofiadas e raízes adventícias (Marcílio et al. 2019; Junglos et al. 2018; Kolb et al. 1998). A deficiência de oxigênio também pode induzir mudanças no metabolismo respiratório das raízes, levando a aceleração da glicólise com produção de etanol, que é o produto final da fermentação alcoólica, catalisada pela enzima álcool desidrogenase (Kolb e Joly 2009; Kreuzwieser et al., 2004).

Estresse adicional pode ocorrer quando as plantas são desalagadas (reaeradas), período em que também pode haver o acúmulo de EROs, tanto nas raízes quanto nas folhas. Em espécies tolerantes, danos celulares são evitados quando EROs atuam na ativação de genes específicos (genes estresse induzidos) resultando na ativação do sistema de defesa antioxidante. Os componentes de defesa antioxidante compreendem os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos incluem, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD) e a peroxidase (POD). Os não enzimáticos são constituídos por compostos do metabolismo secundário, como flavonoides e taninos (Marinho et al. 2020; Khater et al. 2019).

A maioria dos estudos sobre alagamento tem avaliado as plantas enquanto estão alagadas, em detrimento de estudos no pós-alagamento (Voesenek e Bailey-Serres, 2015). Contudo, é importante verificar não só a capacidade de sobrevivência das plantas ao alagamento em si, mas também a capacidade de recuperação de suas atividades fisiológicas após esse período estressante. A capacidade de restabelecimento pós-injúrias provocadas pelo alagamento é crucial para o sucesso do estabelecimento das plantas após o período de hipoxia (Luo et al. 2011), pois, a rápida exposição a uma condição na qual o solo está com uma melhor drenagem, pode expor a planta a um segundo estresse, pela troca radical da condição ambiental. Desse modo, quando retiradas do alagamento e em contato com o oxigênio, plantas menos tolerantes estão sujeitas a danos oxidativos severos, que podem acarretar a morte do indivíduo (Rawyler; Arpagaus; Braendle, 2002).

Embora *Croton urucurana* Baill. seja encontrada naturalmente em formações hidromórficas permanentemente alagadas ou àquelas sujeitas a diferentes níveis de inundação, como as matas ciliares, ela também é encontrada em floresta estacional semidecidual e outras formações vegetais no Brasil, e em outros países como Paraguai, Argentina e Uruguai (Cordeiro et al. 2015; Barbieri et al. 2014; Durigan et al. 2002). *C. floribundus* Spreng. é encontrada em área antrópica, floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila e ciliar, bem como outras

florestas do Brasil e leste do Paraguai (Cordeiro et al. 2015; Silvestrini et al. 2013), sugerindo que esse par congênico apresenta uma importante plasticidade às condições de inundação. Essas espécies são bastante utilizadas em áreas de restauração florestal no Brasil e possuem importância medicinal, com produção de metabólitos secundários bioativos como, flavonoides e alcaloides (Cordeiro et al. 2016; Uchôa et al. 2013; Oliveira et al. 2008; Salatino et al. 2007). Apesar dos compostos e de suas atividades serem conhecidas, pouco se sabe sobre sua produção/variação sob alagamento, sendo importante conhecer a dinâmica de biossíntese desses compostos com importância farmacológica sob essa condição de estresse. De uma forma geral, a falta ou excesso de água podem levar a modificações no metabolismo secundário (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Entretanto, Radaelli et al. (2020) observaram que o teor de compostos fenólicos totais não foi influenciado pela porcentagem de água no substrato, nem pela inundação, com lâmina de água de 5 cm, em mudas de *Plinia* spp.

Para elucidar possíveis estratégias adaptativas que permitem esse par congênico ocupar áreas sujeitas a alagamentos sazonais ou perenes, estudamos o efeito de diferentes tempos de exposição ao alagamento sobre a sobrevivência e o metabolismo primário e secundário de *C. floribundus* e *C. urucurana* (Euphorbiaceae), e seu potencial de recuperação no pós-alagamento. Perguntamos se as espécies são capazes de sobreviver a esse estresse por um período de 90 dias, quais os mecanismos que as permitirão continuar realizando os seus processos fisiológicos, e se a produção de compostos do metabolismo secundário é afetada pelo alagamento. Nossa hipótese é que as duas espécies resistam ao alagamento, já que são naturalmente encontradas em ambientes sujeitos ao alagamento, apresentando certa plasticidade, como por exemplo, aumento da atividade da enzima ADH em plantas alagadas e aumento da atividade de enzimas antioxidantes em plantas reaeradas, e produção de moléculas protetoras como a prolina. Acreditamos que ocorra alteração no teor de metabólitos secundários sob alagamento.

## **Material e métodos**

### **Material vegetal e procedimento experimental**

As mudas de *C. floribundus*, com cerca de 40 cm de altura, foram adquiridas em viveiro comercial, localizado em Londrina-PR (-23.35858; -51.04678) e mudas de *C. urucurana*, com cerca de 60 cm de altura, foram adquiridas em viveiro comercial, localizado em Assis-SP (-22.62974; -50.41951). O experimento, com ambas as espécies, foi conduzido em casa de vegetação com cobertura de plástico transparente, durante os meses de janeiro a maio de 2020. Os dados de temperatura e umidade relativa do ar foram obtidos com termohigrômetro nos dias das avaliações experimentais. Foram obtidas as seguintes medidas: temperatura aos 30, 60 e 90 dias de experimento: 32°C, 35°C e 34°C, umidade relativa do ar: 40%, 21% e 30%, respectivamente.

As mudas foram transplantadas para sacos plásticos medindo 25x30 cm, contendo Latossolo Vermelho distroférico e areia na proporção de 2:1. Após um período de 30 dias de aclimação, os sacos foram colocados em tanques de lona contendo água até 3 cm acima da superfície do substrato, para simular alagamento, por 30, 60 e 90 dias; as mudas não alagadas e irrigadas diariamente foram utilizadas como controle. Para avaliar o potencial de recuperação pós-alagamento, ao término de cada período de alagamento (30, 60 e 90 dias) um lote de plantas foi acompanhado por mais 30 dias sem alagamento do substrato (condição de mudas reaeradas), com irrigação diária.

As avaliações da atividade enzimática, prolina e de compostos do metabolismo secundário foram realizadas em quatro réplicas, e as demais avaliações em seis réplicas. A unidade experimental foi constituída por um saco contendo uma muda. Foram avaliadas as seguintes características:

### **Mudas sobreviventes e alterações morfológicas**

O total de mudas sobreviventes foi computado ao término de cada período de alagamento e no pós-alagamento. Alterações morfológicas como o desenvolvimento de lenticelas hipertróficas e de raízes adventícias foram observadas e descritas ao longo do experimento.

### **Parâmetros fotossintéticos**

A taxa fotossintética ( $A$ ), condutância estomática ( $G_s$ ) e concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) foram obtidas com analisador de gases no infravermelho (IRGA), marca ADC, modelo LCI PRO (Analytical Development Co. Ltda, Hoddesdon, UK). Com esses dados foi calculada a eficiência da carboxilação da Rubisco ( $A/C_i$ ) (Zhang et al. 2001). As medições foram realizadas em folhas totalmente expandidas pertencentes ao terceiro par (do ápice para a base). As avaliações foram realizadas no período da manhã, entre 8 e 11h, sendo considerados apenas os dados medidos sob fluxo fotossintético de fótons ( $FFF$ ) maior que  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

A fluorescência da clorofila  $a$  foi mensurada pelos registros da eficiência quântica potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), e obtida com uso do fluorímetro portátil, modelo OS-30p (Opti-Sciences Chlorophyll Fluorometer, Hudson, USA). A determinação da fluorescência foi realizada entre 8 e 11h da manhã, nas mesmas folhas utilizadas para as avaliações das trocas gasosas. As folhas foram submetidas a um período de 30 minutos de adaptação ao escuro, com o auxílio de cliques adaptadores, antes da realização das medidas. A radiação de excitação constituiu de 1 único flash de 1s a  $1.500 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### **Conteúdo relativo de água e prolina foliar**

O conteúdo relativo de água da folha ( $CRA_f$ ) foi obtido usando discos foliares (coletados às 5h da manhã) de plantas submetidas a cada um dos tratamentos, e calculado pela seguinte

fórmula:  $CRAf(\%) = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$ , onde *MF* é a massa fresca dos discos; *MS* é a massa seca após secagem em estufa e *MT* é a massa túrgida após hidratação dos discos por 24 horas em frascos escuros contendo água destilada, adaptado de Barrs e Weatherley (1962).

Para a extração e quantificação de prolina, amostras das folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar, a 40°C, até massa constante, e trituradas a pó fino. A concentração de prolina foi avaliada pelo método de Bates et al. (1973).

### **Parâmetros de crescimento**

A massa seca da raiz e da parte aérea foi obtida com uso de estufa a 50°C, até massa constante, e balança analítica de precisão.

### **Análise enzimática e proteína total**

Para a preparação do extrato enzimático, 300 mg de folhas frescas foram trituradas em almofariz, com adição de 6 mL de solução de extração gelada, constituída de tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 7, contendo 1% de PVP (Polivinilpirrolidona). Os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm, em centrífuga refrigerada, e os sobrenadantes coletados foram utilizados nas avaliações enzimáticas.

A atividade da guaicol peroxidase (POD) (mg de proteína<sup>-1</sup>) foi determinada por método espectrofotométrico direto, convertendo guaicol para tetraguaiacol a 470 nm (Hammerschmidt et al. 1982), usando um leitor de microplacas ELISA (modelo Expert Plus).

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (mg de proteína<sup>-1</sup>) foi medida de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). As leituras de absorbância foram realizadas a 560 nm usando espectrofotômetro (Espectrofotômetro Visível Metash - modelo V5000).

Em raízes de plantas não alagadas e alagadas por 3, 5, 10, 30, 60 e 90 dias foi avaliada a atividade da enzima do metabolismo anaeróbico ADH (álcool desidrogenase), de acordo com a metodologia descrita por Kolb e Joly (2009).

A proteína total, necessária para calcular a atividade específica das enzimas estudadas, foi quantificada de acordo com a metodologia de Bradford (1976). As leituras de absorvância foram realizadas no espectrofotômetro a 595 nm (Espectrofotômetro Visível Metash - modelo V5000).

### **Compostos do metabolismo secundário e atividade antioxidante**

Os compostos foram quantificados a partir de folhas secas a 40°C e trituradas. A extração foi realizada por contato da amostra (100 mg) com 5 mL de etanol (95%) durante 30 minutos em banho ultrassônico. Após esse período o extrato foi filtrado e secado em rota-evaporador e posteriormente liofilizado. O rendimento obtido foi de 32,8% m:m.

Os compostos fenólicos totais e os flavonoides foram avaliados empregando o método descrito por Djeridane et al. (2006). A quantificação dos alcaloides totais foi determinada de acordo com o procedimento desenvolvido por Oliveira et al. (2006), utilizando menores volumes/massas de extrato e reagentes, porém mantendo as concentrações.

A avaliação da atividade “sequestradora” de radicais livres foi determinada pelo método fotolorimétrico in vitro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A cada 100 µL da amostra (extrato) foram adicionados 3000 µL da solução de DPPH 0,004% e incubada na temperatura ambiente por 30 minutos. O método consistiu no monitoramento do consumo do radical livre DPPH das amostras, através do decréscimo da medida de absorvância realizada em espectrofotômetro a 517 nm. A atividade foi calculada pela fórmula: % redução DPPH=  $(\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs branco} \times 100$ , onde Abs é a absorvância.

## Análise estatística

Para cada espécie, os dados foram testados quanto às premissas de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnoff;  $\alpha = 0,05$ ) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene,  $\alpha = 0,05$ ). As médias foram submetidas à ANOVA fatorial e havendo significância as médias de tempo de experimento e regime de tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey e as médias da interação entre os fatores analisados foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ).

## Resultados

### Mudas sobreviventes e alterações morfológicas

Cerca de 80% das plantas de *C. floribundus* sobreviveram ao alagamento por 60 dias e ao pós-alagamento, mas não sobreviveram ao alagamento até os 90 dias. Todas as plantas de *C. urucurana* sobreviveram ao alagamento por 90 dias e ao pós-alagamento. Ambas as espécies desenvolveram raízes adventícias e lenticelas hipertrofiadas (após 4 dias aproximadamente) na base dos caules nas mudas alagadas (Figura 1).



**Fig. 1** Presença de lenticelas hipertrofiadas e raízes adventícias (R.A) nas mudas de *C. urucurana* (A: controle e B: alagada) e *C. floribundus* (C: controle e D: alagada).

### Parâmetros fotossintéticos

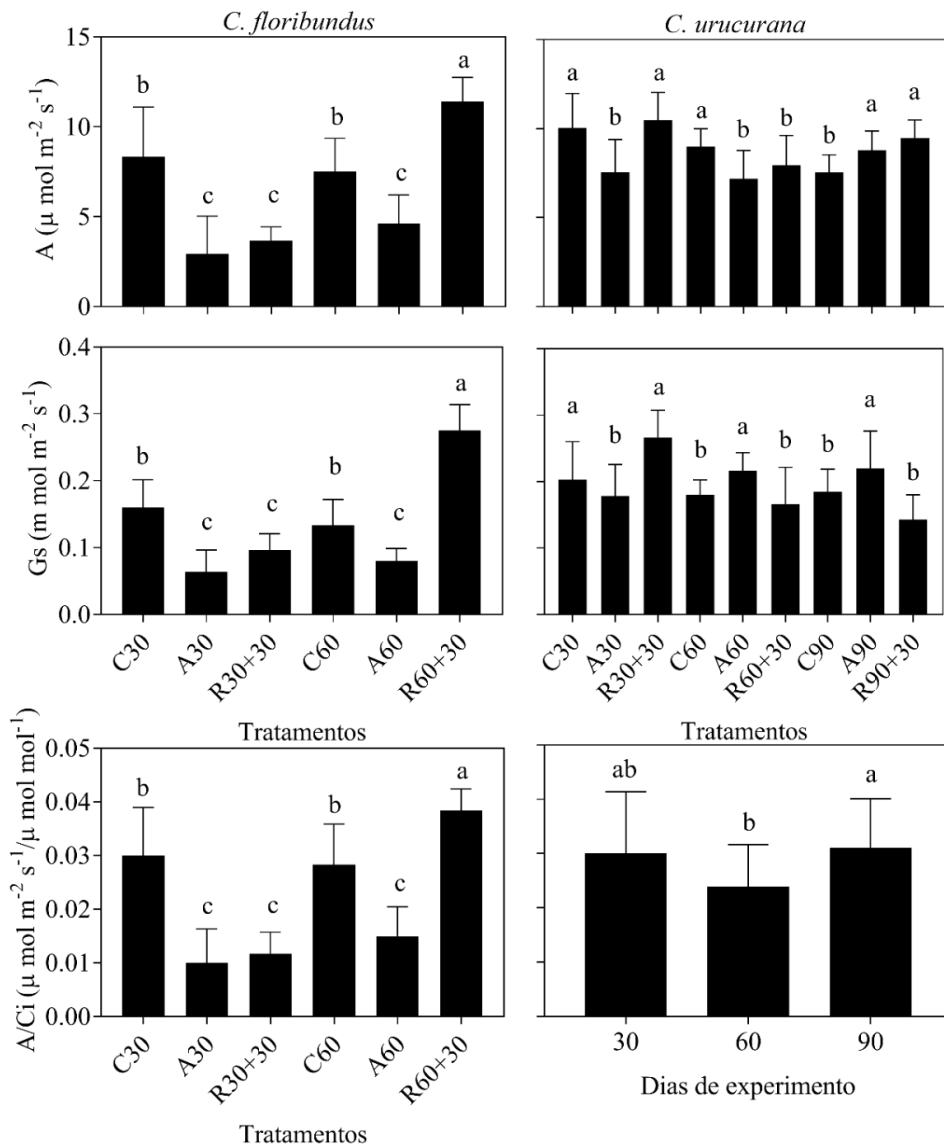
Em *C. floribundus*, a taxa de absorção de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), a condutância estomática ( $G_s$ ) e a eficiência da carboxilação da Rubisco ( $A/C_i$ ) foram influenciadas pelo regime hídrico, tempo de experimento e pela interação entre esses fatores (Material Suplementar, Tabela S1). Em *C. urucurana*,  $A$  e  $G_s$  foram influenciadas pelo tempo de experimento e pela interação entre os fatores analisados, já a  $A/C_i$  foi influenciada apenas pelo tempo de experimento (Material Suplementar, Tabela S1).

Para *C. floribundus* houve decréscimo de  $A$ ,  $G_s$  e  $A/C_i$  nas plantas alagadas aos 30 e 60 dias. Após os 30 dias de alagamento as plantas reaeradas de *C. floribundus* não recuperaram os valores de  $A$ ,  $G_s$  e  $A/C_i$ , contudo, houve recuperação desses valores após os 60 dias de alagamento seguido por 30 dias de reaeramento (Figura 2). Em *C. urucurana* houve decréscimo de  $A$  e  $G_s$  nas plantas alagadas por 30 dias, entretanto houve recuperação desses parâmetros após a suspensão do alagamento (Figura 2). Aos 60 dias houve decréscimo de  $A$  nas plantas alagadas seguido de não recuperação após a suspensão do alagamento. A  $G_s$  aumentou nas plantas alagadas aos 60 dias e os valores foram semelhantes ao controle após o período de reaeração. Aos 90 dias houve aumento de  $A$  e  $G_s$  nas plantas alagadas, sendo que os valores de  $A$  foram mantidos após suspensão do alagamento enquanto os valores de  $G_s$  se igualaram aos do controle (Figura 2). A  $A/C_i$  aos 60 e 90 dias foram semelhantes aos valores desse parâmetro aos 30 dias de experimento, sendo menor aos 60 dias em relação aos 90 dias (Figura 2).

Em *C. floribundus* a  $F_v/F_m$  foi influenciada pelo tempo de experimento e pela interação entre o regime hídrico e o tempo de experimento (Material Suplementar, Tabela S1). Em *C. urucurana*,  $F_v/F_m$  foi influenciada pelo regime hídrico e pelo tempo de experimento (Material Suplementar, Tabela S1).

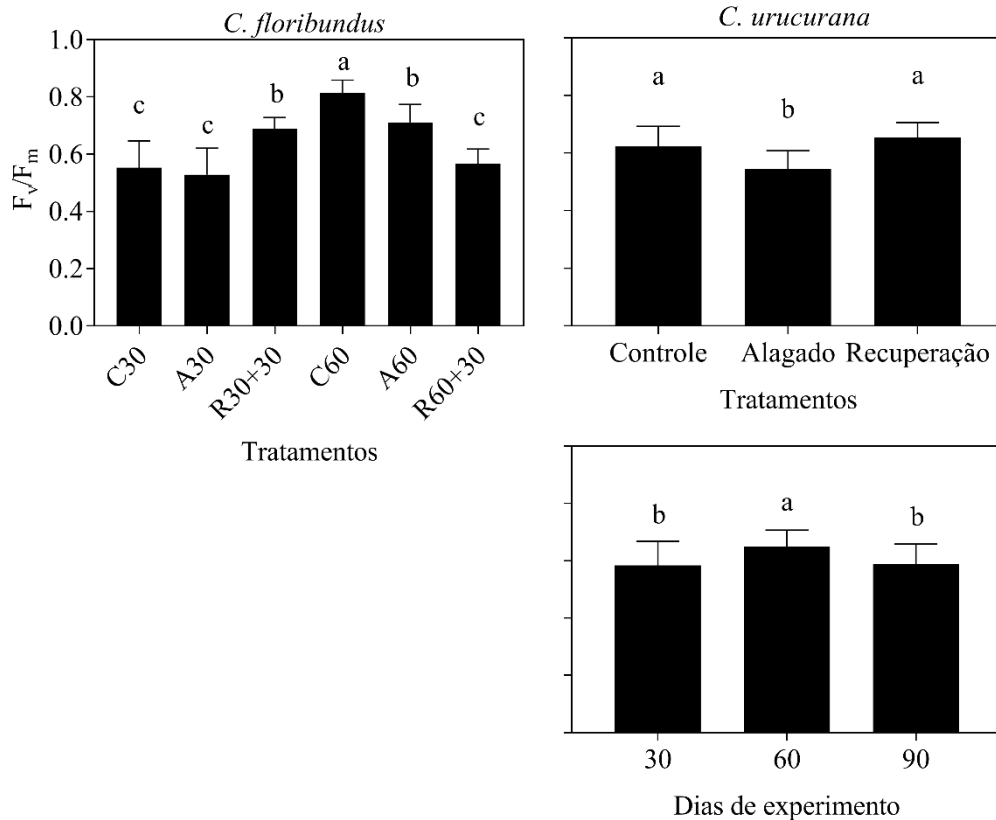
Aos 30 dias não houve diferença de  $F_v/F_m$  entre as plantas controle e as alagadas de *C. floribundus*, porém houve aumento de  $F_v/F_m$  nas plantas que foram submetidas à reaeração, 30

dias após o alagamento (Figura 3). Aos 60 dias houve redução de  $F_v/F_m$  nas plantas alagadas de *C. floribundus*, não ocorrendo recuperação 30 dias após esse período de alagamento (Figura 3). Em *C. urucurana* o alagamento causou redução dos valores de  $F_v/F_m$ , entretanto houve recuperação, sendo esses valores maiores aos 60 dias de experimento (Figura 3).



**Fig. 2** Efeito do alagamento sobre a taxa de absorção de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), condutância estomática ( $G_s$ ) e eficiência da carboxilação da Rubisco ( $A/C_i$ ) em duas espécies de *Croton* e sua capacidade de recuperação pós-alagamento. C30, C60 e C90 = controle por 30, 60 e 90 dias; A30, A60 e A90

= alagado por 30, 60 e 90 dias; R30+30, R60+30 e R90+30 = recuperação (30, 60 e 90 dias de alagamento seguido de 30 dias após a suspensão do alagamento). Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão (n=6). Médias seguidas de mesma letra não variam entre si pelo teste de Scott-Knott ou pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )



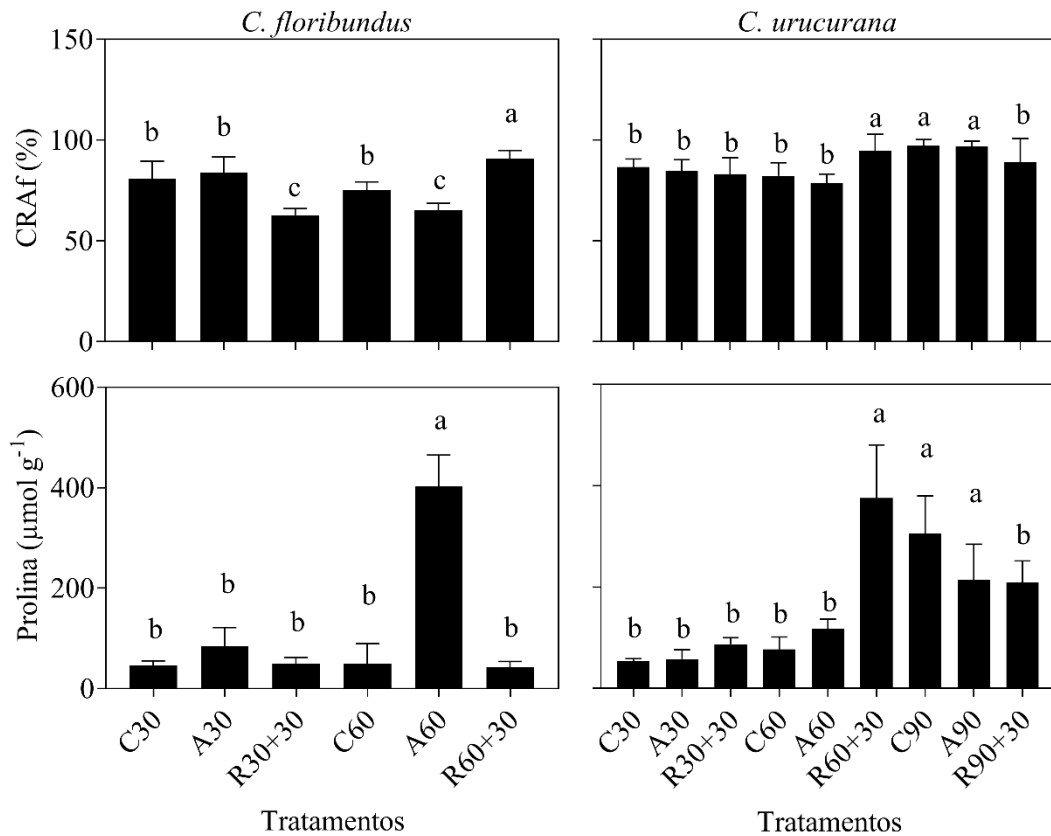
**Fig. 3** Eficiência fotoquímica do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) de duas espécies de *Croton* submetidas ao alagamento e sua capacidade de recuperação pós-alagamento. C30 e C60= controle por 30 e 60 dias; A30 e A60= alagado por 30 e 60 dias; R30+30 e R60+30= recuperação (30 e 60 dias de alagamento seguido de 30 dias após a suspensão do alagamento). Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão (n=6). Médias seguidas de mesma letra não variam entre si pelo teste de Scott-Knott ou pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

### **Conteúdo relativo de água e de prolina nas folhas**

Para ambas as espécies, o *CRAf* e a prolina foram influenciados pelo tempo de experimento e pela interação entre o regime hídrico e tempo de experimento, com exceção da prolina em *C. floribundus*, que foi influenciada pelos fatores analisados e pela interação entre eles (Material Suplementar, Tabela S1).

Em *C. floribundus* não houve diferença do *CRAf* entre as plantas controle e alagadas por 30 dias, entretanto, houve redução desse parâmetro 30 dias após a suspensão do alagamento das plantas. Aos 60 dias o *CRAf* diminuiu nas plantas alagadas, contudo houve recuperação do mesmo após a suspensão do alagamento (Figura 4). Em *C. urucurana* não houve diferença entre os tratamentos aos 30 e 60 dias, com exceção do aumento do *CRAf* após a suspensão do alagamento dos 60 dias, o que não ocorreu com as plantas reaeradas após 90 dias de alagamento, que apresentaram valores menores de *CRAf* em relação às plantas controle e alagadas por 90 dias (Figura 4).

O conteúdo de prolina em *C. floribundus* não variou entre os tratamentos, com exceção de seu aumento nas plantas alagadas por 60 dias (Figura 4). Em *C. urucurana* a prolina aumentou após a suspensão do alagamento dos 60 dias e nas plantas controle e alagadas aos 90 dias de experimento (Figura 4).



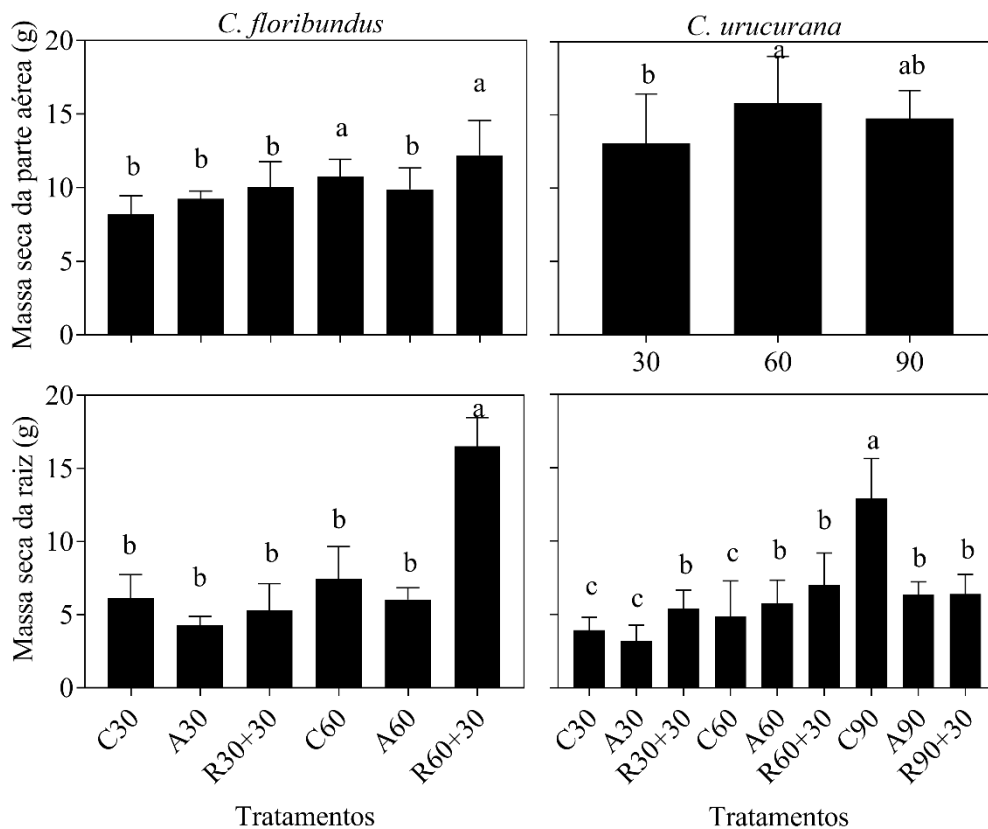
**Fig. 4** Influência do alagamento sobre o conteúdo relativo de água nas folhas (*CRAf*), mensurado às 5h da manhã, e de prolina de duas espécies de *Croton*, e sua capacidade de recuperação pós-alagamento. C30, C60 e C90 = controle por 30, 60 e 90 dias; A30, A60 e A90 = alagado por 30, 60 e 90 dias; R30+30, R60+30 e R90+30 = recuperação (30, 60 e 90 dias de alagamento seguido de 30 dias após a suspensão do alagamento). Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão (n=6). Médias seguidas de mesma letra não variam entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

### Parâmetros de crescimento

A massa seca da parte aérea, em *C. floribundus*, foi influenciada pelo tempo de experimento e pela interação entre o regime hídrico e tempo de experimento. Em *C. urucurana* a massa seca da parte aérea foi influenciada apenas pelo tempo de experimento. Para ambas as

espécies, a massa seca da raiz foi influenciada pelos fatores analisados, bem como pela interação entre eles (Material Suplementar, Tabela S2).

Em *C. floribundus*, a massa seca da parte aérea não diferiu entre os regimes hídricos aos 30 dias, entretanto, houve redução da massa seca da parte aérea nas plantas alagadas por 60 dias em relação às plantas controle nesse período, com recuperação da massa aérea após suspensão do alagamento dos 60 dias. Já a massa seca da raiz aumentou apenas nas plantas do pós-alagamento dos 60 dias (Figura 5). Em *C. urucurana* a massa seca da parte aérea aumentou aos 60 dias em relação ao período anterior. Já a massa seca da raiz não diferiu entre as plantas controle e alagadas aos 30 dias, contudo, houve aumento nas plantas após a suspensão do alagamento dos 30 dias. Aos 60 dias houve incremento de massa seca nas plantas alagadas e nas que foram reaeradas, em comparação com as plantas controle. Adicionalmente, a maior massa seca da raiz foi observada nas plantas controle aos 90 dias, sendo menor e semelhante entre as plantas alagadas por 90 dias e as plantas reaeradas após a suspensão do período de alagamento (Figura 5).



**Fig. 5** Alterações no crescimento de duas espécies de *Croton* submetidas ao alagamento e sua capacidade de recuperação pós-alagamento. C30, C60 e C90 = controle por 30, 60 e 90 dias; A30, A60 e A90 = alagado por 30, 60 e 90 dias; R30+30, R60+30 e R90+30 = recuperação (30, 60 e 90 dias de alagamento seguido de 30 dias após a suspensão do alagamento). Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão (n=6). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelos testes de Scott-Knott ou pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

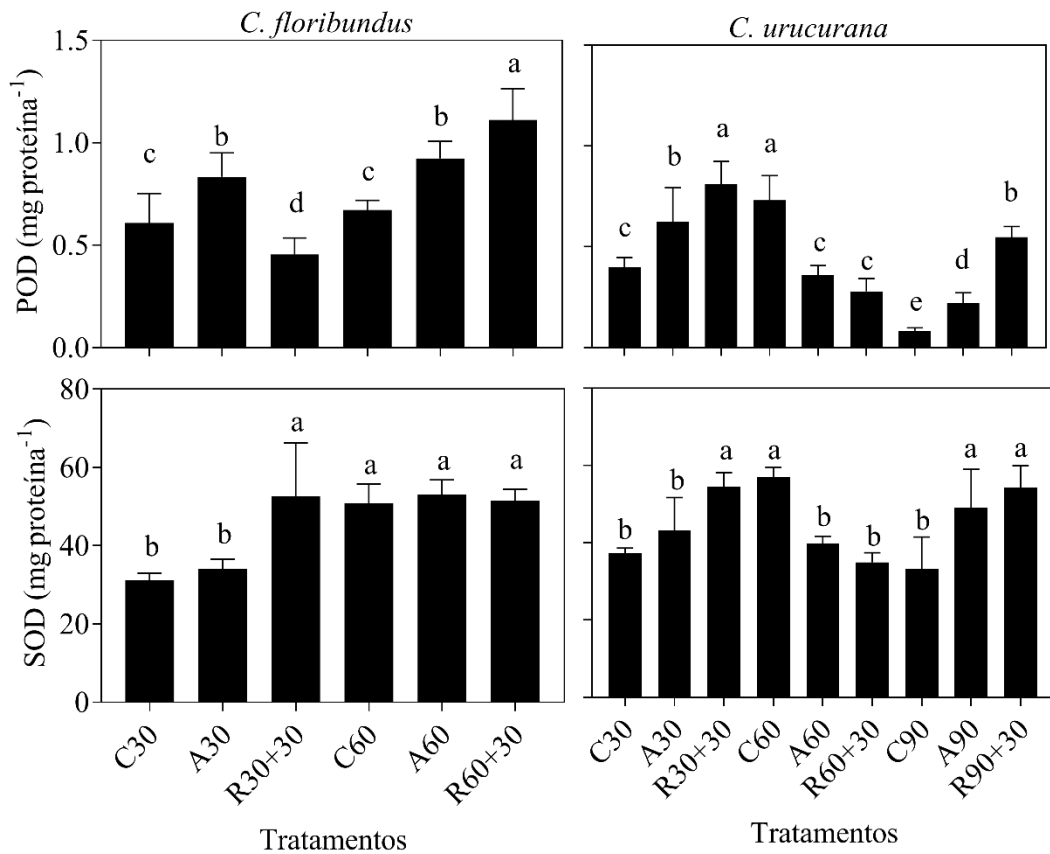
### Atividade enzimática

Em ambas as espécies de *Croton* não houve aumento da atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) nas raízes das plantas alagadas (dados não mostrados).

A atividade da enzima POD, em *C. floribundus*, foi influenciada pelo tempo de experimento e pela interação entre os fatores analisados, enquanto a SOD foi influenciada pelo

regime hídrico, tempo de experimento e pela interação entre esses fatores (Material Suplementar, Tabela S3). Em *C. urucurana*, a POD foi influenciada pelos fatores analisados e pela interação entre eles e a SOD foi influenciada pelo tempo de experimento e pela interação entre os fatores analisados (Material Suplementar, Tabela S3).

Em *C. floribundus*, houve aumento da atividade da POD nas plantas alagadas por 30 e 60 dias em relação às plantas controle, ocorrendo redução apenas nas plantas reaeradas após os 30 dias de alagamento. Já a atividade da SOD não diferiu entre as plantas controle e alagadas aos 30 dias, ocorrendo aumento nas plantas dos demais tratamentos, que não diferiram entre si (Figura 6). Em *C. urucurana*, houve aumento da POD nas plantas alagadas por 30 dias e naquelas após a suspensão do alagamento, bem como nas plantas controle aos 60 dias. A atividade dessa enzima foi reduzida nas plantas alagadas por 60 dias e naquelas reaeradas após suspensão do alagamento. Aos 90 dias houve aumento da POD nas plantas alagadas e no pós-alagamento em comparação com as plantas controle. Já a atividade da SOD aumentou nas plantas reaeradas após o período de 30 dias de alagamento, nas plantas controle aos 60 dias, nas plantas alagadas por 90 dias e nas plantas do tratamento de recuperação após esse período de alagamento (Figura 6).



**Fig. 6** Influência do alagamento sobre as enzimas guaiacol peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD), em folhas de duas espécies de *Croton* e sua capacidade de recuperação pós-alagamento. C30, C60 e C90 = controle por 30, 60 e 90 dias; A30, A60 e A90 = alagado por 30, 60 e 90 dias; R30+30, R60+30 e R90+30 = recuperação (30, 60 e 90 dias de alagamento seguido de 30 dias após a suspensão do alagamento). Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão (n=4). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

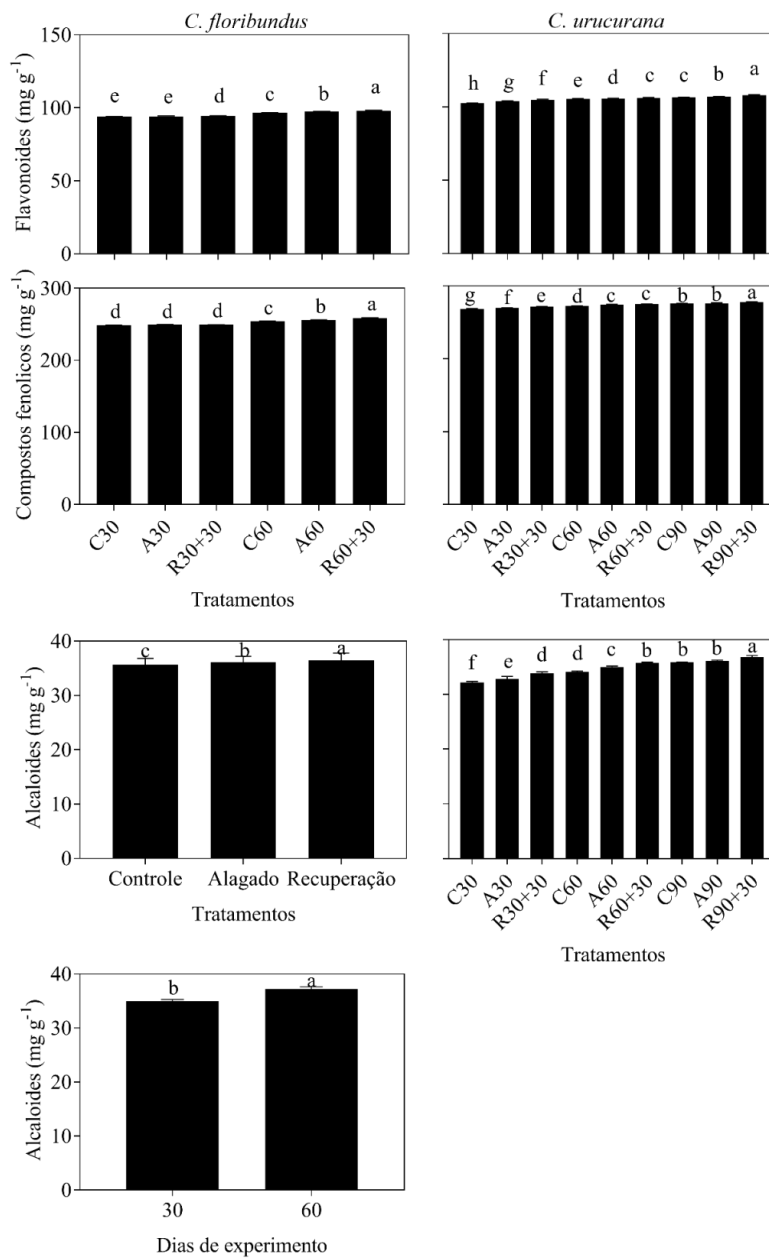
### Compostos do metabolismo secundário e atividade antioxidante

Para ambas as espécies, todos os compostos do metabolismo secundário avaliados foram influenciados pelos fatores analisados, bem como pela interação entre eles, com exceção dos

alcaloides em *C. floribundus*, que foram influenciados apenas pelos fatores analisados (Material Suplementar, Tabela S3).

A quantidade de flavonoides não diferiu entre as plantas controle e alagadas de *C. floribundus* aos 30 dias, entretanto, houve aumento nas plantas pós-alagamento. Aos 60 dias houve aumento de flavonoides nas plantas alagadas e no pós-alagamento em comparação com o controle (Figura 7). Já a quantidade de compostos fenólicos não diferiu entre os regimes de tratamento aos 30 dias, contudo, houve aumento gradativo entre os regimes aos 60 dias, considerando plantas controle, plantas alagadas e as reaeradas, respectivamente (Figura 7). Os alcaloides aumentaram nas plantas alagadas e nas plantas que foram submetidas à recuperação em relação às plantas controle, havendo aumento nas plantas aos 60 dias de experimento (Figura 7).

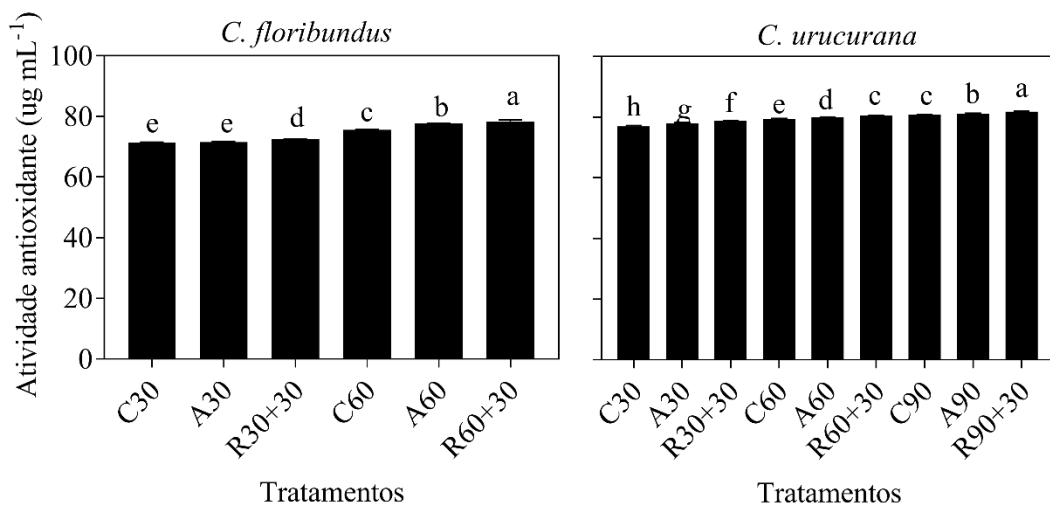
Em *C. urucurana*, a quantidade de flavonoides aumentou nas plantas controle, alagadas e no pós-alagamento ao longo do tempo, sendo que para cada período a quantidade foi maior nas plantas alagadas, seguidas das reaeradas (Figura 7). Já a quantidade de compostos fenólicos e de alcaloides aumentou nas plantas controle, alagadas e no pós-alagamento ao longo do tempo, sendo que para cada período a quantidade foi maior nas plantas alagadas, seguidas das reaeradas, com exceção das plantas controle e alagadas por 90 dias, em que as quantidades foram semelhantes (Figura 7).



**Fig. 7** Alterações nos compostos do metabolismo secundário em folhas de duas espécies de *Croton* submetidas ao alagamento e sua capacidade de recuperação pós-alagamento. C30, C60 e C90 = controle por 30, 60 e 90 dias; A30, A60 e A90 = alagado por 30, 60 e 90 dias; R30+30, R60+30 e R90+30 = recuperação (30, 60 e 90 dias de alagamento seguido de 30 dias após a suspensão do alagamento). Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão (n=4). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelos testes de Scott-Knott ou pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

A atividade antioxidante foi influenciada pelos fatores analisados, bem como pela interação entre eles em ambas as espécies (Material Suplementar, Tabela S3).

Em *C. floribundus*, a atividade antioxidante não diferiu entre as plantas controle e alagadas aos 30 dias, sendo maior nas plantas após o reaeramento. Para o regime hídrico de 60 dias, houve aumento gradativo da atividade antioxidante, considerando plantas controle, plantas alagadas e as reaeradas, respectivamente (Figura 8). Em *C. urucurana*, houve aumento gradativo da atividade antioxidante em todos os tratamentos ao longo do tempo, com valores menores para plantas controle, intermediários para as alagadas e maiores para as reaeradas (Figura 8).



**Fig. 8** Atividade antioxidante em folhas de duas espécies de *Croton* submetidas ao alagamento e a capacidade de recuperação pós-alagamento. C30, C60 e C90 = controle por 30, 60 e 90 dias; A30, A60 e A90 = alagado por 30, 60 e 90 dias; R30+30, R60+30 e R90+30 = recuperação (30, 60 e 90 dias de alagamento seguido de 30 dias após a suspensão do alagamento). Os dados são representados pelas médias  $\pm$  desvio padrão (n=4). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

## Discussão

Nosso interesse maior com esse estudo é o de avaliar respostas metabólicas das duas espécies de *Croton*, frente ao alagamento, por diferentes períodos de tempo, a fim de relacioná-las com suas capacidades de sobrevivência e de desenvolvimento sob esse estresse, bem como no período pós-alagamento, fornecendo subsídios para projetos de restauração florestal com ambas as espécies.

Com relação às respostas do metabolismo primário, as trocas gasosas foliares em ambas as espécies de *Croton* foram reduzidas pelo alagamento. Entretanto, ambas as espécies foram capazes de recuperar os valores de  $A$  e  $G_s$  no pós-alagamento. O decréscimo nos valores de  $A$  pode ser explicado pelo decréscimo concomitante da  $G_s$ . Valores baixos de  $G_s$  têm sido amplamente relatados para muitas espécies, tolerantes ou não ao alagamento (Linné et al. 2021; Kissmann et al. 2014; Oliveira e Joly 2010). A diminuição de  $G_s$  pode ser importante para a sobrevivência de plantas alagadas, pois diminui a transpiração em condições em que a capacidade de absorção de água pelas raízes está prejudicada (Kissmann et al. 2014; Pezeshki, 2001). No entanto, na maioria das espécies tolerantes ao alagamento, a diminuição inicial da  $G_s$  é seguida de recuperação (reabertura estomática) (Medina et al. 2009; Kozlowski, 1997), como foi observado aos 60 dias em *C. floribundus* e ao longo do experimento em *C. urucurana*. A redução de  $A$  em plantas alagadas também pode estar relacionada ao decréscimo na capacidade de carboxilação, observado em *C. floribundus*; valores mais baixos de  $A/C_i$  ocorrem devido aos danos que as condições hipóxicas causam ao aparelho fotossintético, reduzindo a atividade da Rubisco (Cremon et al. 2020; Junglos et al. 2018; Liu et al. 2014). Adicionalmente, o decréscimo de  $A$  nas plantas alagadas pode estar relacionado aos distúrbios no funcionamento do aparelho fotoquímico, como observado em ambas as espécies submetidas ao alagamento. Liu et al. (2014) observaram que o decréscimo de  $A$ , em *Distylium chinense* submetidas ao alagamento, também ocorreu devido a causas não estomáticas, como diminuição de  $F_v/F_m$ .

Reduções na  $F_v/F_m$  em plantas alagadas e reaeradas podem estar relacionadas à ocorrência de EROs, que danificam a estrutura dos cloroplastos, e conseqüentemente reduzem a  $A$  (Yu et al. 2015; Yordanova e Popova 2007).

Embora o alagamento tenha afetado, em algum momento, a fase fotoquímica e bioquímica da fotossíntese de ambas as espécies de *Croton*, os efeitos causados foram temporários e após a suspensão do alagamento, as atividades metabólicas retornaram ao funcionamento normal, indicando plasticidade fenotípica e tolerância fisiológica (Medina et al. 2009). Porém, *C. floribundus* se mostrou mais sensível ao alagamento, já que as mudas não suportaram 90 dias de alagamento.

Quanto ao conteúdo relativo de água nas folhas, observamos que não houve recuperação dos valores após reaeração das plantas de *C. floribundus* alagadas por 30 dias e das plantas de *C. urucurana* alagadas por 90 dias. Porém, *C. floribundus* e *C. urucurana* foram capazes de recuperar seus estados hídricos após a suspensão do alagamento dos 60 dias. Baixo conteúdo relativo de água nas folhas das plantas alagadas e reaeradas pode estar relacionado a redução da  $G_s$ . De acordo com Shabala et al. (2014), o fato de plantas alagadas terem menor disponibilidade hídrica nas folhas pode parecer contraditório, porém a redução da  $G_s$  é a principal causa desse efeito, mas outros fatores, como a diminuição na condutância hidráulica da raiz e mudanças nos níveis de expressão em proteínas intrínsecas da membrana plasmática são também relacionados à redução de água nas folhas de plantas alagadas.

Em relação à prolina, seu aumento indica estresse hídrico, como observado nas plantas de *C. floribundus* alagadas por 60 dias e *C. urucurana* aos 90 dias. Esse aumento causa um tipo de ajuste osmótico para manter o conteúdo de água nos tecidos (Barickman et al. 2019), o que pode ter contribuído para a recuperação do estado hídrico das plantas reaeradas após 60 dias de alagamento.

O alagamento limitou o ganho de biomassa aérea em plantas de *C. floribundus*, o que não ocorreu com *C. urucurana*, indicando que essa espécie é mais resistente. O alagamento geralmente diminui a taxa de crescimento das plantas (Barbosa et al. 2021; Duarte et al. 2020; Kissman et al. 2014; Pezeshki, 2001), provavelmente porque as taxas de trocas gasosas são afetadas, conforme observamos nesse estudo.

Embora não tenha ocorrido diferença no ganho de massa seca da raiz entre as plantas controle e alagadas de *C. floribundus*, aos 30 e 60 dias, essa espécie demonstrou ser mais sensível, pois em *C. urucurana* houve incremento de massa nas raízes alagadas por 60 dias. O incremento de biomassa em situações de saturação hídrica é uma resposta pouco relatada, pois longos períodos de inundação do solo tendem a reduzir a biomassa de raízes, como resultado da decomposição (Grisi et al. 2011). Porém, resultados similares foram encontrados para *Tabebuia cassinoides*, espécie tolerante ao alagamento e típica de florestas inundadas no domínio da floresta tropical atlântica (Kolb e Joly, 2009). Quando o sistema de raízes é comprometido pelo alagamento, a formação de raízes adventícias pode contribuir para manter o suprimento de água e nutrientes para as plantas (Hua et al. 2017; Zhang et al., 2017).

Ambas as espécies não apresentaram aumento da atividade da enzima ADH, indicando que não houve aceleração da fermentação alcoólica. O desenvolvimento de lenticelas hipertrofiadas logo no início do alagamento e a formação de raízes adventícias podem ter contribuído para a não aceleração dessa via (Kreuzwieser et al., 2004; Kolb et al. 1998). O aumento da atividade das enzimas POD e SOD, verificado durante o alagamento, indica a produção de EROs, uma vez que essas enzimas estão diretamente relacionadas ao seu combate. Assim, o aumento da atividade dessas enzimas pode ter contribuído para o maior valor de  $F_v/F_m$  no pós-alagamento dos 30 dias em *C. floribundus*, bem como com a recuperação da  $F_v/F_m$  em plantas alagadas de *C. urucurana*. Karuppanapandian et al. (2011) citaram que uma

forma de defesa das plantas contra condições de deficiência de oxigênio é a expressão de enzimas encarregadas de remover as EROs formadas durante o estresse.

Em relação aos metabólitos secundários, a quantidade de compostos fenólicos, flavonoides e de alcaloides aumentou em ambas as espécies, tanto no alagamento quanto no pós-alagamento, e ao longo do tempo, sendo que alterações no metabolismo secundário são comumente relatadas em plantas submetidas a estresse abiótico (Borges et al. 2017; Loreto e Schnitzler 2010). Os teores de compostos fenólicos foram avaliados por Uriu et al. (2017) em plantas de *Vochysia divergens* submetidas a estação da seca e as cheias no Pantanal. Os autores verificaram que a menor concentração foi registrada no período da seca (folhas jovens), aumentando gradativamente no início do período de enchente, com maiores níveis no final do período de inundação. Os autores concluíram que o aumento na concentração de compostos fenólicos, provavelmente, está associado ao ciclo de inundações do Pantanal, bem como com a fenologia foliar de *V. divergens*. Adicionalmente, outros estudos também sugeriram que o incremento de compostos do metabolismo secundário ao longo do tempo, conforme observado no presente estudo, pode estar relacionado com a idade e o maior desenvolvimento das plantas (Borges et al. 2017; Sampaio et al. 2016).

A atividade antioxidante aumentou nas plantas alagadas e reaeradas em ambas as espécies avaliadas, possivelmente devido ao aumento dos flavonoides, pois alguns autores sugerem que a atividade antioxidante das plantas está relacionada à presença de compostos fenólicos, como flavonoides e taninos (Marinho et al. 2020; Khater et al. 2019). Essa atividade antioxidante pode ter contribuído para neutralizar os danos causados por EROs nas duas espécies de *Croton*, em adição ao aumento da atividade das enzimas POD e SOD.

## Conclusão

Nosso estudo mostra que a capacidade de sobreviver ao alagamento depende do tempo de exposição a essa condição. Ambas as espécies são capazes de sobreviver ao alagamento por período considerável, porém, *C. floribundus* mostrou-se mais sensível do que *C. urucurana*, já que as plantas alagadas não cresceram ao longo dos 60 dias e não sobreviveram aos 90 dias de alagamento. Os mecanismos de adaptação das espécies ao alagamento estão relacionados à sua plasticidade fenotípica, incluindo alterações morfológicas como a formação de lenticelas caulinares hipertrofiadas e raízes adventícias, alterações no metabolismo primário como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e produção de moléculas protetoras como a prolina, e alterações no metabolismo secundário como o aumento de compostos com atividade antioxidante. A atividade de enzimas antioxidantes e a produção de compostos com atividade antioxidante contribuíram não só para o período de alagamento, mas também para a sobrevivência e retomada do crescimento no período pós-alagamento.

Como ambas as espécies são utilizadas em projetos de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas, *C. floribundus* não é indicada para locais onde o alagamento perdura por mais de 60 dias, já que as plantas alagadas não cresceram ao longo dos 60 dias e não sobreviveram aos 90 dias de alagamento. Nesses locais, deve-se dar preferência para *C. urucurana*. Já que ambas as espécies são consideradas plantas medicinais e a propriedade medicinal se deve aos compostos do metabolismo secundário, deve-se dar preferência para o cultivo dessas espécies em locais com boa disponibilidade hídrica.

## Referências

Barbieri DSV, Tonial F, Lopez PA, Maia BHLN, Santos GD, Ribas MO, Glienke C, Vicente VA (2014) Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. Archives of Oral Biology 59:887–896. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.05.006>

- Barbosa LDO, Dresch DM, Scalon L, Scalon SDPQ (2021) Ecophysiological strategies of *Cedrela fissilis*. Vell seedlings under conditions of flooding and light availability. *Journal of Sustainable Forestry* <https://doi.org/10.1080/10549811.2020.1867183>
- Barickman TC, Simpson CR, Sams CE (2019) Waterlogging causes early modification in the physiological performance, carotenoids, chlorophylls, proline, and soluble sugars of cucumber plants. *Plants (Basel)* 8(6):160. <https://doi.org/10.3390/plants8060160>.
- Barrs HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15:413–428. <https://doi.org/10.1071/BI9620413>
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Borges CV, Minatel IO, Gomez-Gomez HA, Lima GPP (2017) Medicinal Plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. In: Ghorbanpour M, Varma A. (eds) *Medicinal Plants and Environmental Challenges*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_15)
- Bourtsoukidis E, Kawaletz H, Radacki D, Schütz S, Hakola H, Hellén H, Noe S, Mölder I, Ammer C, Bonn Boris (2014) Impact of flooding and drought conditions on the emission of volatile organic compounds of *Quercus robur* and *Prunus serotina*. *Trees*, 28(1):193–204. <https://doi.org/10.1007/s00468-013-0942-5>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Copolovici L, Niinemets U (2010) Flooding induced emissions of volatile signalling compounds in three tree species with differing waterlogging tolerance. *Plant, Cell & Environment* 33:1582–1594. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02166.x>
- Cordeiro I, Secco R, Carneiro-Torres DS, Lima LR, De Caruzo MBR, Berry P, Riina R, Silva OLM, Silva MJ, Sodr e RC (2015). Croton in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17546>>.
- Cordeiro KW, Felipe JL, Malange KF, Prado PR, Figueiredo PO, Garcez FR, Freitas KC (2016) Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology* 183:128–13. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.051>

- Cremon T, Scalon SDPQ, Rosa DBCJ, Dresch DM (2020) How does *Copaifera langsdorfi* respond to flooding under different irradiance levels? *Plant Biosystems*. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1832604>
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97:654-660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Duarte CI, Martins AC, Amarante L, Jacobi US, Colares IG (2020) Flood duration differentially affects seed germination, growth and ecophysiology of the swamp tree *Citronella gongonha* from the southern Neotropics. *Flora* 271:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151683>
- Durigan G, Figliolia MB, Kawabata M, Garrido MAO, Baitello JB. Sementes e mudas de árvores tropicais. 2. Ed. São Paulo: Instituto Florestal, 2002. 65 p.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I- Occurrence in higher plants. *Physiologia Plantarum* 59:309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30(2):374. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- Grisi FA, Angelo AC, Boeger MRT, Leitão CAE, Galvão SF, Wendling I (2011) Morfoanatomia foliar em mudas de *Schinus terebinthifolius* sob diferentes níveis de saturação hídrica. *Floresta* 41(4):881-894.
- Hammerschmidt R, Nuckles EM, Kuc J (1982) Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology* 20:73-82. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(82\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0048-4059(82)90025-X)
- Hua J, Han L, Wang Z, Gu C, Yin Y (2017) Morpho-anatomical and photosynthetic responses of *Taxodium* hybrid 'Zhongshanshan' 406 to prolonged flooding. *Flora* 231:29-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2017.04.007>
- IPCC, 2021: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S. L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M. I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T. K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu and B. Zhou (eds.)]. Cambridge University Press. In Press.
- Junglos FS, Junglos MS, Dresch DM, Bento LF, Santiago EF, Mussury RM, Scalon SDPQ (2018) Morphophysiological responses of *Ormosia arborea* (Fabaceae) seedlings under

- flooding and post flooding conditions. *Australian Journal of Botany* 66:489–499. <https://doi.org/10.1071/BT17206>
- Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K, Kim W (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 5:709–725.
- Khater M, Ravishankar D, Greco F, Osborn HM (2019) Metal complexes of flavonoids: their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities. *Future Medicinal Chemistry* 11(21):2845-2867. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc-2019-0237>
- Kissmann C, Veiga EB, Eichemberg MT, Habermann G (2014) Morphological effects of flooding on *Styrax pohlii* and the dynamics of physiological responses during flooding and post-flooding conditions. *Aquatic Botany* 119:7–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2014.06.007>
- Kolb RM, Medri ME, Bianchini E, Pimenta JÁ, Giloni PC, Correa GT (1998) Anatomia ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith and Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. *Revista Brasileira de Botânica* 21:305-312. <https://doi.org/10.1590/S0100-84041998000300010>
- Kolb RM, Joly CA (2009) Flooding tolerance of *Tabebuia cassinoides*: Metabolic, morphological and growth responses. *Flora* 204:528-535. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.07.004>
- Kozłowski TT (1997) Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology* 1:1–29. <https://doi.org/10.1093/treephys/17.7.490>
- Kreuzwieser J, Papadopoulou E, Rennenberg H (2004) Interaction of flooding with carbon metabolism of forest trees. *Plant Biology* 6:299–306. <https://doi.org/10.1055/s-2004-817882>
- Kreuzwieser J, Rennenberg H (2014) Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. *Plant Cell Environ* 37: 2245–2259. <https://doi.org/10.1111/pce.12310>
- Linné JA, Jesus MV, Lima VT, Reis LC, Dresch DM, Scalón SPQ, Santos CC (2021) Effects of shading on growth and photosynthetic metabolism in *Dipteryx alata* Vogel seedlings under flooding. *Brazilian Journal of Botany* 44:629–638. <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00735-7>
- Lin J, Zhang R, Hu Y, Song Y, Hänninen H, Wu J (2019) Interactive effects of drought and shading on *Torreya grandis* seedlings: physiological and growth responses. *Trees* 33:951–961. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01831-8>

- Liu Z, Cheng R, Xiao W, Guo Q, Wang N (2014) Effect of off-season flooding on growth, photosynthesis, carbohydrate partitioning, and nutrient uptake in *Distylium chinense*. Plos One 9:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107636>
- Lopes JS, Costa KCP, Fernandes VS, Gonçalves JFC (2019) Functional traits associated to photosynthetic plasticity of young Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) plants. Flora 258:151446. <https://doi.org/10.1016/j.fora.2019.151446>
- Loreto F, Schnitzler JP (2010) Abiotic stresses and induced BVOCs. Trends Plant Science 15(3):154–166. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.006>
- Luo FL, Nagel KA, Scharr H, Zeng B, Schrr U, Matsubara S (2011) Recovery dynamics of growth, photosynthesis and carbohydrate accumulation after desubmergence: A comparison between two wetland plants showing escape and quiescence strategies. Annals of botany 107(1):49-63. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq212>
- Marcílio T, Barbeiro C, Firmino TP, Romagnolo MB, Souza LA, Pastorini LH (2019) Flooding and submersion-induced morphological and physiological adaptive strategies in *Lonchocarpus cultratus*. Aquatic Botany 159:103146. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2019.103146>
- Marinho TA, Oliveira MG, Menezes-Filho ACP, Castro CFS, Oliveira IMM, Borges LL, Melo-Reis PR, Silva-Jr NJ (2020) Phytochemical characterization, and antioxidant and antibacterial activities of the hydroethanolic extract of *Anadenanthera peregrina* stem bark. Brazilian Journal of Biology 82:1-12. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234476>
- Martínez LM, Fernández-Ocaña A, Rey PJ, Salido T, Amil-Ruiz F, Manzaneda AJ (2018) Variation in functional responses to water stress and differentiation between natural allopolyploid populations in the *Brachypodium distachyon* species complex. Annals of Botany 121:1369–1382. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy037>
- Medina CL, Sanches MC, Tucci MLS, Sousa CAF, Cuzzuol GRF, Joly CA (2009) *Erythrina speciosa* (Leguminosae-Papilionoideae) under soil water saturation: morphophysiological and growth responses. Annals of Botany 104:671–680.
- Oliveira IS, Lima JCS, Silva RM, Martins DTO (2008) Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. Revista Brasileira de Farmacognosia 18:587-593. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400016>
- Oliveira MAC, Albuquerque MM, Xavier HS, Strattmann RR, Júnior SG, Queiroz AT (2006) Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de alcaloides totais como berberina em fitoterápico contendo *Berberis vulgaris* L. Revista Brasileira de Farmacognosia 16:357-364. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300013>

- Oliveira VC, Joly CA (2010) Flooding tolerance of *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae): morphological, physiological and growth responses. *Trees* 24:185–194. <https://doi.org/10.1007/s00468-009-0392-2>
- Pezeshki SR (2001) Wetland plant responses to soil flooding. *Environment Experimental Botany* 46:299–312. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00107-1](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00107-1)
- Salatino A, Salatino MLF, Negri G (2007) Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18(1):11-33. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>
- Sampaio B, Edrada-Ebel R, Da Costa, F (2016) Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Scientific Reports* 6:1-11. <https://doi.org/10.1038/srep29265>
- Radaelli JC, Guollo K, Neto CK, Silva M, Simões F, Junior AW (2020) Inundação em mudas de jabuticabeira. *Research, Society and Development* 9(11):e60591110087. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10087>
- Rawlyer A, Arpagaus S, Braendle R (2002) Impact of oxygen stress and energy availability on membrane stability of plant cells. *Annals of Botany* 90(4):499-507. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf126>
- Shabala S, Shabala L, Barcelo J, Poschenrieder C (2014) Membrane transporters mediating root signalling and adaptive responses to oxygen deprivation and soil flooding. *Plant Cell & Environment* 37:2216–2233. <https://doi.org/10.1111/pce.12339>
- Silvestrini M, Pinto-Maglio CAF, Zucchi MI, Santos FAM (2013) Cytogenetics and characterization of microsatellite loci for a South American pioneer tree species, *Croton floribundus*. *Genome* 56:743–751. <https://doi.org/10.1139/gen-2013-0159>
- Slabbert RM, Krüger GHJ (2011) Assessment of changes in photosystem II structure and function as affected by water deficit in *Amaranthus hypochondriacus* L. and *Amaranthus hybridus* L. *Plant Physiology Biochemistry* 49:978–984. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.05.001>
- Uchôa PKS, Silva Jr JN, Silveira ER, Lima MAS (2013) Trachylobane and kaurane diterpenes from *Croton floribundus* Spreng. *Química Nova* 36(6):778-782. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600006>
- Uriu DD, Godoy BSA, Battirola LD, Andrighetti CR, Marques MI, Valladao DMS (2017) Temporal variation of the total phenolic compounds concentration in *Vochysia divergens* Pohl. (Vochysiaceae) leaves in the Brazilian pantanal. *Revista Árvore*. 41(3):1-10. <https://doi.org/10.1590/1806-90882017000300016>

- Voesenek LA, Bailey-Serres J (2015) Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist* 206:57–73. <https://doi.org/10.1111/nph.13209>
- Wu J, Wang J, Hui W, Zhao F, Wang P, Su C, Gong W (2022) Physiology of plant responses to water stress and related genes: A review. *Forests* 13:1-16. <https://doi.org/10.3390/f13020324>
- Yordanova R, Popova LP (2007) Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 29(6):535-541 <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0064-z>
- Yu B, Zhao Cy, Li J, Li Jy, Peng G (2015) Morphological, physiological, and biochemical responses of *Populus euphratica* to soil flooding. *Photosynthetica*, 53(1):110-117. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0088-3>
- Zhang S, Li Q, Ma K, Chen L (2001) Temperature dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO<sub>2</sub> assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday higher irradiance. *Photosynthetica* 39:383-388. <https://doi.org/10.1023/A:1015130326683>
- Zhang Q, Huber H, Beljaars SJ, Birnbaum D, Best S, de Kroon H, Visser EJ (2017) Benefits of flooding-induced aquatic adventitious roots depend on the duration of submergence: linking plant performance to root functioning. *Annals of Botany* 120:171–180. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx049>

### Material suplementar

Tabela 1 – Resultados da Anova dois fatores para os efeitos do regime hídrico, tempo de tratamento (T) e sua interação (regime hídrico x T) sobre parâmetros fisiológicos foliares das duas espécies de *Croton* avaliadas. A/E: eficiência do uso da água, A/Ci: eficiência imediata da carboxilação da Rubisco, Fv/Fm: eficiência fotoquímica do fotossistema II, CRA foliar: capacidade de retenção de água foliar.

Parâmetros	<i>C. floribundus</i>		<i>C. urucurana</i>	
	F	p	F	p
Taxa de absorção de CO <sub>2</sub>				
Regime hídrico	37,746	0,0000	2,862	0,1041
T	15,718	0,0012	4,203	0,0246
Regime hídrico x T	12,409	0,0007	4,221	0,0079

Parâmetros	<i>C. floribundus</i>		<i>C. urucurana</i>	
	F	p	F	p
Condutância estomática				
Regime hídrico	52,037	0,0000	0,442	0,6550
T	18,912	0,0006	3,482	0,0437
Regime hídrico x T	23,372	0,0000	7,202	0,0003
A/E				
Regime hídrico	19,189	0,0004	17,189	0,0006
T	0,282	0,6030	43,285	0,0000
Regime hídrico x T	19,651	0,0001	23,956	0,0000
A/Ci				
Regime hídrico	39,634	0,0000	2,364	0,1443
T	19,756	0,0005	3,750	0,0352
Regime hídrico x T	14,451	0,0003	1,645	0,1888
Fv/Fm				
Regime hídrico	3,721	0,0620	38,148	0,0000
T	23,629	0,0002	6,244	0,0054
Regime hídrico x T	27,964	0,0000	0,951	0,4486
CRA foliar				
Regime hídrico	1,681	0,2348	0,624	0,5556
T	22,200	0,0000	12,655	0,0001
Regime hídrico x T	0,781	0,0000	6,037	0,0011
Prolina				
Regime hídrico	73,672	0,0001	0,937	0,4426
T	40,865	0,0000	12,189	0,0005
Regime hídrico x T	80,882	0,0000	4,318	0,0127

Tabela 2 – Resultados da Anova dois fatores para os efeitos do regime hídrico, tempo de tratamento (T) e sua interação (regime hídrico x T) sobre parâmetros de crescimento das duas espécies de *Croton* avaliadas.

Parâmetros	<i>C. floribundus</i>		<i>C. urucurana</i>	
	F	p	F	p
Massa seca da parte aérea				
Regime hídrico	13,170	0,0858	3,573	0,0665
T	13,645	0,0022	4,307	0,0230
Regime hídrico x T	2,823	0,0373	0,885	0,5183
Área foliar				
Regime hídrico	35,558	0,0000	0,140	0,9336
T	2,535	0,1322	0,267	0,7678
Regime hídrico x T	74,721	0,0000	3,529	0,0096

Parâmetros	<i>C. floribundus</i>		<i>C. urucurana</i>	
	F	p	F	p
Comprimento da parte aérea				
Regime hídrico	2,012	0,1843	6,381	0,0162
T	2,501	0,1347	10,597	0,0004
Regime hídrico x T	2,162	0,1496	2,604	0,0384
Massa seca da raiz				
Regime hídrico	28,882	0,0001	4,207	0,0462
T	134,823	0,0000	29,007	0,0000
Regime hídrico x T	62,367	0,0000	8,789	0,0000

Tabela 3 – Resultados da Anova dois fatores para os efeitos do regime hídrico, tempo de tratamento (T) e sua interação (regime hídrico x T) sobre atividade enzimática, compostos do metabolismo secundário e atividade antioxidante das duas espécies de *Croton* avaliadas.

Parâmetros	<i>C. floribundus</i>		<i>C. urucurana</i>	
	F	p	F	p
Peroxidase				
Regime hídrico	0,546	0,6053	13,226	0,0063
T	6,085	0,0151	57,724	0,0000
Regime hídrico x T	0,403	0,0000	48,734	0,0000
Superóxido dismutase				
Regime hídrico	11,865	0,0082	1,962	0,2210
T	16,846	0,0005	11,561	0,0000
Regime hídrico x T	6,781	0,0000	37,695	0,0000
Fenois				
Regime hídrico	78,304	0,0001	100,611	0,0000
T	2347,328	0,0000	3233,599	0,0000
Regime hídrico x T	44,991	0,0000	18,038	0,0000
Alcaloides				
Regime hídrico	110,258	0,0000	67,415	0,0001
T	1472,451	0,0000	978,169	0,0000
Regime hídrico x T	3,866	0,0614	5,286	0,0054
Flavonoides				
Regime hídrico	63,359	0,0001	1657,898	0,0000
T	1146,292	0,0000	494,581	0,0000
Regime hídrico x T	8,278	0,0091	10,723	0,0001
Atividade antioxidante				
Regime hídrico	169,627	0,0000	63,833	0,0001

Parâmetros	<i>C. floribundus</i>		<i>C. urucurana</i>	
	F	p	F	p
T	2365,917	0,0000	1036,283	0,0000
Regime hídrico x T	33,536	0,0001	5,120	0,0062

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As respostas morfofisiológicas à seca e ao alagamento diferem entre as espécies estudadas, ainda que estas compartilhem, em algum momento, o mesmo habitat natural.

Ambas as espécies apresentam certa tolerância ao déficit hídrico moderado e ao alagamento, entretanto, *C. floribundus* é mais sensível à seca e ao alagamento do que *C. urucurana*, pois plantas expostas a 25% da CRAs não sobreviveram, como também não toleraram o alagamento por 90 dias.

As duas espécies de *Croton* apresentam plasticidade adaptativa à seca e ao alagamento, representada por modificações no metabolismo primário, como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (que auxiliou na redução dos efeitos gerados pelos estresses), e produção de moléculas protetoras como a prolina. Ambas as espécies também apresentam alterações no metabolismo secundário, porém, os efeitos dos estresses foram opostos no teor de metabólitos secundários. Assim, sob seca houve decréscimo no teor de compostos fenólicos, alcaloides, flavonoides e atividade antioxidante. Sob alagamento houve aumento desses compostos e da atividade antioxidante. Adicionalmente, plantas de *C. floribundus* e *C. urucurana* apresentam modificações morfológicas sob alagamento, como o desenvolvimento de lenticelas hipertrofiadas nos caules e produção de raízes adventícias, que estão relacionadas com a melhor eficiência das trocas gasosas sob hipoxia.

Os resultados obtidos na presente tese fornecem dados suficientes para conhecer a capacidade de sobrevivência de cada espécie de *Croton* ao déficit hídrico prolongado e ao alagamento, e a possibilidade de plantio em locais sujeitos a estresse (de diferentes intensidades e duração). Como ambas as espécies são utilizadas em projetos de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas, *C. floribundus* não é indicada para locais sujeitos a seca moderada ou severa, por longos períodos, já que as plantas não se desenvolveram a 50% e morreram sob 25% CRAs. Ela também não é indicada para locais sujeitos a alagamentos prolongados, já que as mudas não sobreviveram aos 90 dias de alagamento. Para estas condições ambientais, deve-se dar preferência para espécies como *C. urucurana*, que conseguem crescer em locais sujeitos a seca moderada e sobreviver sob seca mais severa, por longos períodos, e ao alagamento por 90 dias.

Para o cultivo de ambas as espécies de *Croton*, para utilização como plantas medicinais, deve-se dar preferência para locais com boa disponibilidade hídrica.