



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS



MARIA REIS VALOIS COELHO

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM *HYPTIS*
***FRUTICOSA* SALZM. EX. BENTH E *OCIMUM GRATISSIMUM* L.**
SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS

FEIRA DE SANTANA - BA

2014

MARIA REIS VALOIS COELHO

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM
HYPTIS FRUTICOSA SALZM. EX. BENTH E *OCIMUM
GRATISSIMUM* L. SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS**

FEIRA DE SANTANA - BAHIA

2014

MARIA REIS VALOIS COELHO

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM
HYPTIS FRUTICOSA SALZM. EX. BENTH E *OCIMUM
GRATISSIMUM* L. SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Dra. Claudinéia Regina Pelacani Cruz
Coorientadora: Dra. Marilza Neves do Nascimento

FEIRA DE SANTANA - BAHIA

2014

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

C618a Coêlho, Maria Reis Valois
Alterações fisiológicas e metabólicas em *Hyptis fruticosa* Salzm. ex. Beth e *Ocimum gratissimum* L. sob diferentes regimes hídricos / Maria Reis Valois Coêlho. – Feira de Santana, 2014.
74 f. : il.

Orientadora: Claudinéia Regina Pelacani Cruz.
Co-orientadora: Marilza Neves do Nascimento

Mestrado (dissertação) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2014.

1. *Hyptis fruticosa*. 2. *Ocimum gratissimum*. 3. Plantas medicinais.
I. Cruz, Claudinéia Regina Pelacani, orient. II. Nascimento, Marilza Neves do, co-orient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana.
IV. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto

Profa. Dra. Coorientadora Marilza Neves do Nascimento
Coorientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana- BA
2014

Aos meus pais Neto e Marina, Semari, Marise e Fábio pelo amor, força e incentivo durante a execução do mestrado.

AGRADECIMENTOS

DEUS por mostrar-me ser capaz para a realização deste trabalho.

Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Dra. Marilza Nascimento pela orientação, ensinamentos, paciência e disponibilidade durante toda a condução do experimento e confecção da dissertação de mestrado.

Dra. Claudinéia Pelacani pelos conselhos e oportunidade de execução deste trabalho.

Dr. Lenaldo Muniz pelos conselhos, ensinamentos e por ceder o projeto de pesquisa.

Dr. André Azevedo pelo auxílio e por disponibilizar seu laboratório para as análises bioquímicas.

Dr. Alberto Lêdo pelos ensinamentos e por auxiliar na estatística deste trabalho.

Dra. Lia Miranda pelo auxílio e disponibilização da Bomba de Scholander e IRGA.

Aos professores doutores do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais José Raniere Santana, Adriana Passos e Hugo Brandão, pelos ensinamentos transmitidos ao longo das disciplinas.

Me. Daniel de Jesus pela orientação, disponibilidade, grande auxílio, apoio e amizade.

Fábio Farias, Keylla Sousa, Bianca Azevedo pelo apoio, amizade e grande auxílio na execução deste trabalho de mestrado.

Meninos da Agronomia/UEFS Davi, Romeu e Pedro, pelo grande auxílio na execução deste trabalho de mestrado.

Mara Rúbia pelo auxílio com as análises de trocas gasosas.

Colegas do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela troca de conhecimento, convivência e momentos de descontração.

Funcionários do Horto florestal pela convivência e por facilitarem a execução deste trabalho.

RESUMO

Hyptis fruticosa Salzm. ex. Benth e *Ocimum gratissimum* Lindl. são espécies da família lamiaceae de grande importância medicinal, no entanto, têm sido objetos de poucos estudos relacionados às técnicas de cultivo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento e tolerância de plantas de *H. fruticosa* e *O. gratissimum* cultivadas em vasos submetidas a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada durante o período de treze dias (*H. fruticosa*) e nove dias (*O. gratissimum*). O experimento foi realizado em telado sob delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (100, 75, 50 e 0% de reposição de água evapotranspirada). Verificou-se que não houve diferenças significativas da massa seca total e área foliar entre os tratamentos nas espécies *H. fruticosa* e *O. gratissimum*. As duas espécies apresentaram os menores valores de teor relativo de água, potencial hídrico, clorofilas e carotenóides no tratamento 0% de reposição de água. Em *O. gratissimum*, houve redução da assimilação líquida de carbono, condutância estomática e transpiração com o aumento do déficit hídrico, porém a concentração interna de CO₂ foi superior no tratamento 0% de reposição de água. As duas espécies apresentaram acúmulo de aminoácidos livres, prolina, proteínas solúveis e carboidratos solúveis de acordo com o aumento do déficit hídrico. O teor de óleo essencial aumentou com o incremento da disponibilidade hídrica em *O. gratissimum*, mas não apresentou diferença significativa entre os tratamentos em *H. fruticosa*. A espécie *O. gratissimum* mostrou-se mais sensível e *H. fruticosa* mais tolerante à deficiência hídrica.

Palavras-chave: Estresse hídrico. Trocas gasosas. Pigmentos cloroplastídicos. Ajustamento osmótico. Óleo essencial.

ABSTRACT

Hyptis fruticosa Salzm. Ex. Benth and *Ocimum gratissimum* Lindl are species from lamiaceae family of great medicinal importance, notwithstanding, they have been goals of few studies related to the cultivation techniques. Therefore, the study's goal was to evaluate the behavior and tolerance of plants of *H. fruticosa* and *O. gratissimum* cultivated in vases submitted to different levels of evapotranspired water reposition during thirteen days (*H. fruticosa*) and nine days (*O. gratissimum*). The experiment was made in greenhouse under randomized complete block design with four treatments (100, 75, 50 and 0% of evapotranspired water reposition). It was verified that there were not any significant difference of total dry mass and leaf area among the treatments in the species *H. fruticosa* and *O. gratissimum*. Both of them presented the lowest values of relative water content, water potential, chlorophylls and carotenoids in the water reposition 0% treatment. In *O. gratissimum*, there was the decrease in net assimilation of carbon, stomatal conductance and transpiration with the water deficit increase, but the CO₂ inside concentration was higher in the water reposition 0% treatment. The two species presented amino acid accumulation, proline, soluble proteins and soluble carbohydrate according to the water deficit increase. The essential oil content increased with the water availability increment in *O. gratissimum*, but it did not present the significant difference among the treatments in *H. fruticosa*. *O. gratissimum* revealed itself more sensitive and *H. fruticosa* more tolerant to the water deficiency.

Key words: Water stress. Gas exchanges. Chloroplastid pigments. Osmotic adjustment. Essential oil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	1
1.2 LAMIACEAE.....	2
1.3 DEFICIÊNCIA HÍDRICA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.4
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10

CAPITULO I: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM HYPTIS

FRUTICOSA SALZM EX. BENTH SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS 17

3. INTRODUÇÃO.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5. RESULTADOS	23
5.1 TEOR RELATIVO DE ÁGUA E POTENCIAL HÍDRICO	24
5.2 MASSA SECA E ÁREA FOLIAR.....	25
5.3 PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS.....	26
5.4 SOLUTOS ORGÂNICOS.....	29
5.5 TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL	31
6. DISCUSSÃO	32
6.1 TEOR RELATIVO DE ÁGUA E POTENCIAL HÍDRICO	32
6.2 MASSA SECA E ÀREA FOLIAR.....	33
6.3 PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS.....	34
6.4 SOLUTOS ORGÂNICOS.....	35
6.5 TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL	36
7. CONCLUSÕES.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

CAPITULO II: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM OCIMUM

GRATISSIMUM L.SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS..... 43

3. INTRODUÇÃO	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
5. RESULTADOS	49
5.1 TEOR RELATIVO DE ÁGUA E POTENCIAL HÍDRICO	49
5.2 MASSA SECA E ÁREA FOLIAR	51
5.3 TROCAS GASOSAS	51
5.4 PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS	54
5.5 SOLUTOS ORGÂNICOS	55
5.6 TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL	58
6. DISCUSSÃO	58
6.1 TEOR RELATIVO DE ÁGUA E POTENCIAL HÍDRICO	58
6.2 MASSA SECA E ÁREA FOLIAR	60
6.3 TROCAS GASOSAS	62
6.4 PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS	64
6.5 SOLUTOS ORGÂNICOS	66
6.6 TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL	68
7. CONCLUSÕES	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9. CONCLUSÕES GERAIS	74

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais é uma prática muito antiga, comum entre as populações tradicionais devido a ser uma fonte de tratamento de doenças. As plantas medicinais podem ser usadas na forma de cocções, infusões, alimentos, óleos essenciais, medicamentos e cosméticos, mas apesar das diversas utilidades, as plantas medicinais são utilizadas em sua maioria para fins terapêuticos. De acordo com Ferro (2008) cerca de quatro bilhões da população mundial utilizam espécies medicinais para o tratamento de algum problema de saúde.

A vasta popularização do uso das plantas medicinais no mundo, aliada ao crescente aumento de iniciativas para a produção de medicamentos pelas indústrias farmacêuticas e o desenvolvimento de pesquisas de diversos órgãos governamentais e não governamentais, permitem cada dia mais a exploração de plantas medicinais na fitoterapia. Anualmente há um movimento de cerca de 40 bilhões de dólares pela indústria mundial de fitoterápicos, tendo o Brasil contribuição de somente 1\40 deste lucro (FERRO, 2008). O Brasil, apesar de possuir grande diversidade de plantas medicinais em sua flora, ainda apresenta pouca participação no mercado de plantas medicinais, resultado oriundo de falta de políticas públicas para o desenvolvimento da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE, 2006). No entanto, ações importantes foram feitas para o estímulo do uso consciente de plantas medicinais, através da criação, pelo Ministério da Saúde, de uma relação de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde, que tem como intuito contribuir para o desenvolvimento da cadeia produtiva através da regulamentação, cultivo/manejo, produção, comercialização e distribuição de plantas medicinais e fitoterápicos (NASCIMENTO JUNIOR, 2009), o que traz boas perspectivas para o futuro das pesquisas e para o desenvolvimento da produção e economia envolvendo plantas medicinais no Brasil.

A produtividade de culturas de plantas em geral, pode ser alterada por fatores abióticos como disponibilidade hídrica, luminosidade, temperatura e nutrientes, portanto, na produção de plantas medicinais deve ser levado em consideração o

manejo dos recursos hídricos, uma vez que a disponibilidade hídrica é capaz de aumentar produção de plantas medicinais e, influenciar na produção e composição de seus metabólitos secundários (SILVA et al., 2002, MARQUES et al., 2009, MEIRA et al., 2013 GOBBO-NETO; LOPES, 2007, SELMAR; KLEINWACHTER, 2013). Desta forma, torna necessário o desenvolvimento de pesquisas sobre a relação recurso hídrico x planta medicinal para viabilizar maior produção de metabólitos secundários para o contexto econômico e medicinal, como também para permitir a conservação das plantas medicinais utilizando-se um extrativismo sustentável.

1.2 Lamiaceae

A família Lamiaceae (Labiatae) é formada por cerca de 300 gêneros e 7.500 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008). As espécies desta família podem possuir hábito em forma erva ou arbusto e raramente em árvore, geralmente apresentando características como caule quadrangular, folhas opostas e simples, inflorescência cimosa, flores bissexuadas e zigomorfas, cálice pentâmero e gamossépalo, corola pentâmera e gamopétala geralmente bilabiada e dois a quatro estames livres, gineceu com ovário supero com dois carpelos e fruto em baga (SOUZA; LORENZI, 2008). Esta família apresenta grande valor comercial, sendo usada na indústria de perfumes e cosméticos, em condimentos e alimentos, porém destaca-se por ser uma família produtora de óleos voláteis de grande importância medicinal (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Dentre os gêneros produtores de óleo essencial podem ser destacados *Hyptis*, *Leonoti*, *Leucas*, *Mentha*, *Ocimum* e *Origanum*.

O gênero *Hyptis*, constituído por mais de 300 espécies aromáticas, são comumente utilizadas no tratamento de dor, infecções da pele, infecções gastrintestinais e câibras (MORAIS et al., 2005).

A espécie *Hyptis fruticosa* Salzm. ex. Benth. popularmente conhecida por “alecrim de vaqueiro” “alecrim do tabuleiro” é predominante nos estados da Bahia e Sergipe, sendo bastante utilizada pela população no combate à dor na forma de chá de suas folhas (SILVA et al., 2006). Pesquisas envolvendo esta espécie destacaram atividade antinociceptiva e não toxicidade aguda do extrato aquoso (SILVA et al., 2006) e óleo essencial (FRANCO et al. 2011a, MENEZES et al.,

2007) em camundongos, atividade antioxidante e anti-inflamatória em extratos etanólicos (ANDRADE et al., 2010), atividade de regeneração hepática em ratos com hepatectomia (LIMA et al. 2012), efeito vasorelaxante do extrato diclorometano em artéria mesentérica de ratos (MOREIRA et al, 2010). Além disso, o óleo essencial de *H. fruticosa* pode ser considerado como uma importante alternativa de inseticida para o controle de larvas de *Aedes aegypti*, no momento em que fornece uma fonte rica de compostos bioativos que são biodegradáveis e não tóxicos (SILVA et al., 2008).

Entre os principais grupos que podem ser encontrados no óleo essencial de *H. fruticosa* estão os sesquiterpenos hidrocarbonetos e hidrocarbonetos monoterpenos, dentre os quais 1,8-cineole, spathulenol, α -pinene, β -pinene, α e β -caryophyllene e bicyclogermacrene (FRANCO et al. 2011b). A composição química deste óleo pode variar de acordo com as partes da planta, estágio de crescimento e parâmetros geográficos em que *H. fruticosa* está inserida (FRANCO et al. 2011b).

O gênero *Ocimum* possui 150 espécies, dentre elas estão *Ocimum gratissimum*, *Ocimum americanum*, *Ocimum basilicum* e *Ocimum campechianum*. As espécies são popularmente conhecidas como alfavacas ou manjericões. O gênero destaca-se pela utilização de suas espécies na culinária, na fitoterapia e como repelente de insetos (LAWRENCE, 1992). Este gênero possui diversas propriedades contra patógenos, apresentando atividade antibacteriana (NAKAMURA et al. 1999) e antifúngica (NWOSU; OKAFOR, 1995). Possui também propriedades anti-inflamatórias (RABELO et al. 2003), antidiarréica (OFFIAH; CHIKWENDU, 1999) e hipoglicemiante (AGUIYI, 2000).

A espécie *O. gratissimum* é uma espécie de origem africana naturalizada no Brasil. Seu óleo essencial tem apresentado atividade inibitória para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexineri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Proteus mirabilis* (NAKAMURA et al. 1999), e atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* (LEMOS et al. 2005) e para o patógeno de frutos *Colletotrichum gloeosporioides* (AQUINO et al., 2012). Em seu óleo essencial podem ser encontrados os seguintes compostos de origem fenólica e terpênica: 1,8 cineol, eugenol, metil-eugenol, timol, pcimeno, cis-ocimeno e cis-cariofileno, trans-cariofileno, beta cariofileno, germacreno-D, β -

bisaboleno, α -trans-trans-farneseno, α -selineno, β -bourboneno, β -cubebeno, linalol, isodieno, delta cadideno, α -Copaeno, γ -Muuroleno e δ -Cadineno. De acordo com o quimiotipo da espécie, esta pode apresentar como componente majoritário o eugenol, que chega a compor mais de 90% do óleo essencial de *O. gratissimum* (AQUINO et al., 2012, NAKAMURA et al. 1999, BIASE et al., 2009, SILVA et al. 2010), sendo que o teor de óleo essencial e de eugenol são maiores nas folhas do que nas flores (BIASE et al., 2009).

1.3 Deficiência hídrica

A água constitui cerca de 80% a 95% da massa dos tecidos vegetais em crescimento, sendo necessária como meio, reagente ou substrato do metabolismo vegetal, translocação e transporte de solutos, turgescência celular, abertura e fechamento estomático, fotossíntese, crescimento e desenvolvimento do vegetal. Portanto, a água é um dos principais recursos essenciais para a manutenção da vida da planta (PIMENTEL, 2004, TAIZ; ZEIGER, 2004). O excesso ou a falta de água acarreta injúrias e diminuição da produtividade das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013), o que torna necessário conhecer a quantidade de água a ser fornecida no cultivo para que seja efetuado um manejo consciente com o qual as plantas se desenvolvam de forma satisfatória, melhorando a qualidade da produção, evitando desperdício de água e reduzindo custos na irrigação.

Em ambientes naturais e agricultáveis as plantas estão frequentemente expostas às variações na disponibilidade de água, que muitas vezes as sujeitam à condição de estresse acarretada por excesso ou pela falta deste recurso (TAIZ; ZEIGER, 2013). No processo de estresse por seca, as plantas passam por um período sem precipitação durante o qual o conteúdo de água do solo é reduzido de tal modo que as plantas sofrem (LARCHER, 1986). O efeito da falta de água nas plantas dependerá da intensidade, duração e velocidade de imposição do estresse, como também, da fase de desenvolvimento da planta quando submetida ao estresse (KRAMER; BOYER, 1995). Segundo Nepomuceno et al. (2001) a maioria das mudanças ocorridas nas plantas em condições de limitações na disponibilidade de água visa à manutenção do seu crescimento e reprodução.

O desequilíbrio do fluxo de água no sistema solo-planta-atmosfera desencadeia déficits hídricos e mau funcionamento de inúmeros processos

celulares (TAIZ; ZEIGER, 2013). No processo de déficit hídrico, a planta tem a sua fisiologia alterada em nível de movimento estomático, fotossíntese, respiração, translocação e partição de fotoassimilados (TAIZ; ZEIGER, 2004); o que torna o estresse hídrico um dos fatores ambientais mais importantes que podem regular o crescimento e o desenvolvimento vegetal, limitando a produção (JONES; CORLET, 1992).

A resposta ao déficit hídrico se dá através da aclimatação como forma de diminuir o efeito do estresse, porém, quando a deficiência hídrica torna-se mais severa ocorrem danos funcionais e perdas dos órgãos da planta (CHAVES et al., 2003) devido a alterações na temperatura, pH, formação de moléculas reativas de oxigênio, desnaturação de proteínas, degradação de clorofilas e membranas celulares, entre outras (APEL; HIRT, 2004, SOARES; MACHADO, 2007, ARUNYANARK et al., 2008, TAIZ; ZEIGER, 2013). Desta forma, para evitar a perda de água e os consequentes danos acarretados pelo déficit hídrico, mecanismos de respostas (bioquímicos, fisiológicos e anatômicos) são acionados pela planta, sendo o controle da condutância estomática uma das primeiras respostas à deficiência hídrica realizada pelas plantas.

Os estômatos são estruturas responsáveis pelo processo de trocas gasosas nas plantas, regulando a entrada de CO₂ e a saída de H₂O e O₂. Em condições de déficit hídrico, os estômatos se fecham devido a perda de turgor nas células-guarda por saída direta de água para a atmosfera decorrente da baixa umidade do ar. Este processo também pode ocorrer devido à saída de solutos osmoticamente ativos modulada pela ação do ácido abscísico quando as folhas ou raízes estão desidratadas (TAIZ; ZEIGER, 2013). O fechamento estomático ocorre progressivamente em função da diminuição da disponibilidade de água para planta (MAGALHÃES FILHO et al. , 2008), sendo que o grau da condutância estomática e a velocidade com que os estômatos se fecham vai depender da sensibilidade das espécies e genótipos ao déficit hídrico (ARAÚJO et al., 2010).

O fechamento estomático ocorre para impedir a perda de água pela transpiração e para possibilitar que planta conserve seu conteúdo de água em condições de déficit hídrico. Redução da densidade e tamanho dos estômatos (MELO et al. 2007), verticalização foliar, abscisão foliar, murcha das folhas, deposição lipídica foliar, redução na produção de biomassa das folhas também

são mecanismos de aclimatação apresentados por plantas para a redução da transpiração em condições de estresse hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O fechamento estomático tem efeitos benéficos, pois permite que a planta mantenha o seu conteúdo de água protegendo-a da desidratação, porém, interrompe processos essenciais para a planta como a entrada de CO₂, matéria prima para o processo fotossintético, e a transpiração que é um processo necessário para o resfriamento da folha, aceleração da ascensão da seiva do xilema e para aumento da absorção de minerais (PIMENTEL, 2004). Como resultado, plantas em condições de estresse hídrico apresentam menor assimilação de carbono (GONÇALVES et al., 2010, SAUSEN; ROSA, 2010), aumento da temperatura foliar e menor captação de água e nutrientes pelo xilema (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Quando os estômatos estão fechados a absorção de CO₂ é bloqueada afetando o processo fotossintético ao nível de carboxilação (PINHEIRO; CHAVES, 2011). A assimilação de carbono também é afetada por processos não-estomáticos oriundos das alterações nas atividades enzimáticas, como por exemplo, a diminuição da atividade da RUBISCO (PARRY, et al., 2002). Além da fase bioquímica da fotossíntese, a fase fotoquímica também pode ser afetada ao nível do fotossistema II (GHANNOUM et al., 2003, ARAÚJO et al., 2010). Sob déficit hídrico as membranas das tilacóides e os pigmentos fotossintéticos são degradados (LOGGINI et al., 1999, KOKSAL et al., 2010), desestruturando os fotossistemas e desta forma, as folhas deixam de captar a radiação luminosa e produzir ATP e NADPH que seriam utilizados para a realização do metabolismo da célula vegetal. Como consequência dos fatores citados acima, as folhas deixam de produzir os fotoassimilados de forma satisfatória, desestabilizando o equilíbrio fonte\dreno e prejudicando processos como o crescimento e o desenvolvimento das plantas.

Dos trabalhos que tratam do efeito do estresse hídrico sobre a assimilação de carbono grande parte destes relata a redução da taxa de fotossíntese líquida entre as épocas de avaliação, em função dos dias de exposição ao estresse hídrico e da diminuição da disponibilidade hídrica, dos quais podem ser citados estudos com variedades de cana de açúcar (GONÇALVES et al., 2010) genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) (ARAÚJO et al., 2010), com a espécie

Ricinus communis (SAUSEN; ROSA, 2010), laranjeira (*Citrus sinensis*) (MAGALHÃES FILHO et al., 2008), orégano (MARQUES et al., 2009), buriti (*Mauritia vinifera*) (CALBO; MORAES, 1997) e em gramíneas C4 (GHANNOUM et al., 2003).

Quando as plantas estão expostas à deficiência hídrica o crescimento além de ser afetado pela redução na assimilação de carbono e inibição da divisão celular, sofre efeito da inibição da expansão celular (OSORIO et al., 1998, TAIZ; ZEIGER, 2013) devido à diminuição da turgescência. A pressão de turgor positiva é importante para o crescimento das células vegetais, pois permite a distensão das paredes celulares (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em condições de déficit hídrico são observadas alterações no crescimento e desenvolvimento de diversas partes da planta, com limitação do tamanho, número de folhas e ramos (SILVA, 2011, TAIZ; ZEIGER, 2013) e redução da biomassa da parte aérea e raiz (MAGALHÃES FILHO et al., 2008).

Apesar de o déficit hídrico promover a redução do crescimento de diversos órgãos vegetais, é possível observar o crescimento de raízes em direção as zonas do solo mais úmidas. Este processo ocorre devido à redução da expansão foliar que acarreta menor consumo de carbono e energia pela parte aérea, que por sua vez disponibiliza uma maior proporção de fotoassimilados para o crescimento de raízes (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O potencial hídrico é comumente utilizado como uma medida de status hídrico de uma planta, pois é ele quem governa o transporte da água através das membranas. Para que a planta retire água do solo é necessário que esta apresente um potencial hídrico menor que o do solo. Em condições de seca o solo tende a apresentar um potencial hídrico mais baixo que a planta, o que impede a captação de água pela planta e provoca a perda de água da mesma para o solo (TAIZ; ZEIGER, 2013). Porém, algumas plantas quando estão expostas ao estresse hídrico desencadeiam vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos para que esta mantenha seu status hídrico, entre um deles está o ajustamento osmótico, processo pelo qual ocorre o acúmulo de solutos para diminuir o potencial osmótico e manter o turgor das células em limites adequados (BRAY, 1997). Os compostos acumulados são aminoácidos livres, açúcares livres, íons inorgânicos (potássio, cloreto) e ácidos orgânicos (INGRAM, 1996). A

acumulação de solutos ativos no ajuste osmótico permite com que a célula permaneça túrgida, protegendo-a na desidratação (GUO; OOSTERHUIS, 1997), pois diminui o potencial hídrico da planta em relação ao solo e permite a raiz captar e impedir a perda de água.

No processo de ajuste osmótico os íons acumulados são compartimentalizados nos vacúolos para impedir que estes reajam com enzimas e estruturas subcelulares no citosol, desta forma, compostos orgânicos chamados de solutos compatíveis, não interferem nas funções das enzimas, e assim podem ser acumulados no citosol (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Além do ajuste osmótico, as moléculas orgânicas têm a capacidade de proteger as estruturas intracelulares da alteração do pH, aumento da temperatura e contra radicais livres em plantas submetidas à condições de deficiência hídrica. Entre elas podem ser citadas o aminoácido prolina, o carboidrato trehalose e as enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase (NEPOMUCENO et al., 2001, APEL; HIRT, 2004).

A prolina é um dos mais importantes compostos compatíveis acumulados em processo de estresse abiótico. O aumento de prolina em condições de estresse pode ser oriundo do estímulo da sua síntese, diminuição da sua oxidação; queda na sua incorporação em proteínas; e aumento da proteólise (PIMENTEL, 2004). Em plantas estressadas a síntese e o catabolismo deste aminoácido são estimulados pelo processo de desidratação e reidratação, respectivamente. Quando as plantas estão desidratadas, a enzima P5CS (Pirrolina-5-carboxilato sintase) que converte glutamato a prolina, é ativada no cloroplasto, ao mesmo tempo a enzima PDH (prolina desidrogenase) responsável pela degradação de prolina fica inativa, ocorrendo o aumento do nível deste metabólito na célula. Quando as plantas voltam a ser reidratadas, os níveis de prolina decaem na célula, devido ativação da transcrição da enzima (PDH) que converte prolina à glutamato na mitocôndria, e a inativação da enzima de síntese (P5C) (HARE; CRESS, 1997, PIMENTEL, 2004, VERBRUGGEN; HERMANS, 2008, SZABADOS; SAVOURE, 2009).

Segundo Shevyakova (1984) o acúmulo de prolina nas plantas sob estresse poderia ser decorrente da regulação osmótica e proteção da integridade celular, onde tal acúmulo teria também a função de proteger as células dos

processos de desnaturação sob estresse hídrico e salino. A acumulação de prolina em células de vegetais submetidas a estresse osmótico tem sido sugerida também, como: estabilizador de estruturas sub-celulares, sequestradora de radicais livres, depósito de energia, componente da cascata de sinalização molecular do estresse e constituinte principal de proteínas da parede celular de plantas (SCHOBERT; TSCHESCHE, 1978, HARE; CRESS, 1997, VERBRUGGEN; HERMANS, 2008, SZABADOS; SAVOURE, 2009, NEPOMUCENO et al., 2001).

O acúmulo de prolina em condições de estresse pode contribuir para regulação do pH celular, preservando a atividade de enzimas, e para manter as proporções de NADP⁺/NADPH normais proporcionando o fluxo de elétrons, evitando a fotoinibição e danos ao aparelho fotossintético (HARE; CRESS, 1997).

Quando as condições de estresse são amenizadas e as plantas voltam a ser hidratadas, a prolina pode exercer uma função importante no processo de recuperação do estresse, uma vez que a sua degradação na mitocôndria poderia prover um grande pool de moléculas redutoras capazes de fornecer energia para o processo respiratório, como também poderia contribuir como fonte de carbono e nitrogênio necessários para o restabelecimento das plantas após o estresse (HARE; CRESS, 1997).

Os carboidratos também têm sido bem evidenciados na literatura por se acumularem em plantas sob condições de estresse hídrico (CARVALHO, 2005), no entanto, sabe-se que o déficit hídrico em plantas prejudica a fotossíntese o que acarreta menor produção de carboidratos (MELO et al., 2007). Ao mesmo tempo, fontes de reserva de carbono são mobilizadas e convertidas em carboidratos mais acessíveis para as atividades celulares. Assim, o amido é convertido à açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) que exercem funções importantes quando acumuladas em plantas condicionadas ao estresse. De acordo com Rosa et al.(2009) os açúcares solúveis desempenham funções distintas no metabolismo de plantas estressadas. Por exemplo, a sacarose e a glicose podem agir como osmoprotetores e substrato da respiração celular, e a frutose parece estar envolvida com a produção de metabólitos secundários (ROSA et al., 2009).

O estresse hídrico por afetar processos críticos, como fotossíntese, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, conseqüentemente pode

levar à alteração dos metabólitos secundários. O efeito da seca na concentração destes metabólitos vai depender do grau de estresse e da duração do estresse, sendo que um período curto de estresse hídrico pode levar a uma produção aumentada dos metabólitos secundários e quando o período é prolongado ocorre a diminuição da produção (GOBO-NETO; LOPES, 2007).

O aumento da síntese de metabólitos secundários tem sido sugerido como resultado da diminuição do CO₂ interno, diminuição da atividade do ciclo de Calvin e aumento da oferta de agentes redutores (NADPH) para as vias metabólicas secundárias de síntese de isoprenóides, fenóis ou alcalóides (SELMAR; KLEINWACHTER, 2013).

Trabalhos relatando a disponibilidade hídrica, como um dos principais fatores que afetam rendimento e qualidade dos princípios ativos, vêm estimulando o desenvolvimento de novos estudos relacionados com diferentes tratamentos hídricos em plantas medicinais, destacando-se estudos relacionando à produção de óleos essenciais. Nestes estudos algumas plantas apresentam maior produção de óleo em condições de maior disponibilidade de água, enquanto outras respondem de forma controversa. (SILVA et al., 2002, MARQUES et al., 2009, LOPES et al., 2011, MEIRA et al., 2013).

Estudos relatando o efeito da disponibilidade de água na produção de óleo essencial e fisiologia de *O. gratissimum* e *Hyptis fruticosa* são incipientes. Desta forma o presente estudo do efeito do déficit hídrico nessas espécies de importância medicinal, servirá como uma fonte de informação para novos estudos, no intuito de melhorar a produção de princípios ativos, produtividade e manejo da água no cultivo de *O. gratissimum* e *H. fruticosa*.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIYI, J. C.; OBI, C. I.; GANG, S. S. Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. **Fitoterapia**, v.71, p.444-446, 2000.
- ANDRADE, A. M., et al. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leaf extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.6, p.962-968, dez., 2010.

- AQUINO, C. F., et al. Ação e caracterização química de óleos essenciais no manejo da antracnose do maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1059-1067, dez., 2012.
- ARAÚJO, S. A. C., et al. Características fotossintéticas de genótipos de capim-elefante anão (*Pennisetum purpureum* Schun.) em estresse hídrico. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 32, n.1, p. 1-7, 2010.
- ARUNYANARK, A., et al. Chlorophyll Stability is an Indicator of Drought Tolerance in Peanut. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.194, p.113-125, 2008.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Physiology**, v.55, p.373-399, 2004.
- BIASI, L. A., et al. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 35-39 jan.-mar., 2009.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148 p.
- BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v.2, p.48-54, 1997.
- CALBO, M. E. R.; MORAES, J. A. P. V. Fotossíntese, condutância estomática, transpiração e ajustamento osmótico de plantas de buriti submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, n.2, p.117-123, 1997.
- CARVALHO, C. J. R.. Respostas de plantas de *Schizolobium amazonicum* [*S. parahyba* var. *amazonicum*] E *Schizolobium parahyba* [*Schizolobium parahybum*] à deficiência hídrica. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p.907-914, 2005.
- CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v.30, p.239-264, 2003.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, 2002, 604p.
- FRANCO, C. R. P., et al. Bioassay-guided evaluation of antinociceptive properties and chemical variability of the essential oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**. v. 25, p. 1693-1699, mar., 2011a.
- FRANCO, C. R. P. et al. Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.1, p.24-32, jan.-feb., 2011b.

- FERRO, Degmar. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2008. xxiii, 502 p.
- GHANNOUM, O., et al. Nonstomatal limitations are responsible for drought induced photosynthetic inhibition in four C4 grasses. **New Phytologist**, v.159, p. 599–608, 2003.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2., p.374-381, 2007.
- GONÇALVES, E. R., et al. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.4, p.378–386, 2010.
- GUO, C., OOSTERHUIS, D. M. Effect of water-deficit stress and genotypes on pinitol occurrence in soybean plants. **Environmental and Experimental Botany**. v.37, p.2-5, 1997.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A.. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p.79-102, 1997.
- INGRAN, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.377-403, 1996.
- JONES, H. J.; CORLET, J. E. Current topics in drought physiology. **Journal of Agricultural Science**, v.119, p.291-296, 1992.
- KRAMER, P. J., BOYER, J. S. 1995. **Water relations of plants and soils**. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- KÖKSAL, E. S., et al. Estimating water stressed dwarf green bean pigment concentration through hyperspectral indices. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 3, p.1895-1901, 2010.
- LARCHER, Walter. **Ecofisiologia vegetal**. Sao Paulo: EPU, 1986. 319p.
- LAWRENCE, B.M. Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. In: HARLEY, R.M.; REYNOLDS, T. (Eds). **Advances in Labiatae Science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992, 399-436p.
- LEMOS, J. A., et al. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 55-58, Feb., 2005.
- LIMA, S. O., et al. Proliferative effect of aqueous extract of *Hyptis fructicosa* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.27, n., p.71-75, 2012.

- LOGGINI, B., et al. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1091-1099, mar., 1999.
- LOPES, O. D., et al. Determinação do coeficiente de cultura (Kc) e eficiência do uso de água do alecrim-pimenta irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.6, p.548-553, 2011.
- MAGALHÃES FILHO, J. R., et al. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranja 'valência' sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, v.67, n.1, p.75-82, 2008.
- MARQUES, P. A. A.; BERNADI FILHO, L.; SANTOS, A. C. P. Crescimento, produção de óleo essencial e trocas gasosas em orégano influenciados por diferentes lâminas de irrigação. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1888-1892, set, 2009.
- MEIRA, M. R., et al. Crescimento vegetativo, produção de fitomassa e de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob diferentes lâminas de irrigação. **Ciência Rural**, v.43, n.5, p.779-785, mai., 2013.
- MELO, H. C., et al. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, v. 34, n.2, p.145-153, 2007.
- MENEZES, I. A. C., et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice, **Fitoterapia**, v. 78, p.192–195, feb, 2007.
- MORAIS, S. M., et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.169-177, 2005.
- MOREIRA I. J. A, et al.. Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.5, p. 762-766, out.-nov., 2010.
- NAKAMURA, C. V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro-RJ, v.94, n.5, p.675-678, 1999.
- NASCIMENTO JUNIOR, J. N. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Disponível em:< http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/daf_sem_fito.pdf>. Brasília: 2009. Acesso em: 20.abril.2013.
- NEPOMUCENO, A. L., et al. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biociência**, v.11, n.23, p.12-18, nov.- dez., 2001.

- NWOSU, M. O.; OKAFOR, J. I. Preliminary studies of the antifungal activities of some medicinal plants against *Basidiobolus* and some other pathogenic fungi. **Mycoses**, v.38, n. 5-6, p.191-195, 1995.
- OFFIAH, V. N.; CHIKWENDU, U. A. Antidiarrhoeal effects of *Ocimum gratissimum* leaf extract in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.68, p.327-30, 1999.
- OSORIO, J., et al. Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globules*. **Tree Physiology**, v.18, p.363-373, 1998.
- PARRY, M. A. J., et al.. Rubisco activity: effects of drought stress. **Annals of Botany**, v.89, p. 833-839, 2002.
- PIMENTEL, Carlos. **A Relação da Planta com a Água**. Rio de Janeiro: EDUR, 2004, 191p.
- PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.3, p.869-882, 2011.
- RABELO, M. et al. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.521-524, 2003.
- ROSA, M., et al. Soluble sugars - Metabolism, sensing and abiotic stress. A complex network in the life of plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.4, n.5, 2009.
- SAUSEN, T. L.; ROSA, L. M. G. Growth and carbon assimilation limitations in *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) under soil water stress conditions. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p.648-654, 2010.
- SCHOBERT, B.; TSCHESCHE, H. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 541, p.270-277, 1978.
- SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. **Plant and Cell Physiology**, v.54, n. 6, p.817-826, 2013.
- SILVA, S. R. S., et al.. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.
- SILVA, A. B. L., et al. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 4, p. 475-479, out.-dez., 2006.

- SILVA, W. J., et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v.99, p.3251-3255, 2008.
- SILVA, L. L. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.5, p.700-705, out.-nov., 2010.
- SILVA, M. B. R., et al. Crescimento e produção do pinhão-mansão irrigado com água residuária sob condições de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 6, p.621-629, 2011.
- SHEVYAKOVA, N. I., 1984. Metabolism and the physiological role of proline in plants under conditions of water and salt stress. **Soviet Plant Physiology**, v.30, p.597- 608p.
- SOUZA, Vinicius; LORENZI, Harry - 1949. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2. ed Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 704 p.
- SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 9-19, 2007.
- SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v.15, n.2, p. 89-97, 2009.
- TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 3.ed Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, p.753-759, 2008.

**CAPÍTULO I : ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM
HYPTIS FRUTICOSA SALZM. EX. BENTH SOB DIFERENTES
REGIMES HÍDRICOS**

(Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais)

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM *HYPTIS FRUTICOSA* SALZM. EX. BENTH SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS

RESUMO

Hyptis fruticosa Salzm. ex. Benth é uma espécie medicinal predominante dos estados da Bahia e Sergipe, porém pouco se sabe sobre as técnicas de seu cultivo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de plantas de *H. fruticosa* cultivadas em vasos diante de diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada durante o período de 13 dias. O experimento foi realizado em telado sob delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (100, 75, 50 e 0% de reposição de água). Durante o período experimental foram feitas três avaliações para determinação do teor relativo de água, potencial hídrico e teor de pigmentos cloroplastídicos. Ao fim do experimento foi determinada a massa seca total, área foliar, teor de óleo essencial e de solutos orgânicos. Verificou-se que não houve diferenças significativas da massa seca total, área foliar e teor de óleo essencial entre os tratamentos. O tratamento 0% de reposição de água apresentou os menores valores de teor relativo de água, potencial hídrico, clorofilas e carotenóides. O acúmulo de aminoácidos livres, prolina e proteínas solúveis e carboidratos solúveis ocorreu de acordo com a redução da disponibilidade hídrica indicando ajustamento osmótico. Desta forma a espécie *H. fruticosa* mostrou-se tolerante á deficiência hídrica de curta duração.

Palavras-chave: Estresse hídrico. Ajustamento osmótico. Pigmentos cloroplastídicos. Óleo essencial.

METHABOLIC AND PHYSIOLOGIC CHANGES IN *HYPTIS FRUTICOSA* SALZM. EX. BENTH UNDER DIFFERENT WATER REGIMES.

ABSTRACT

Hyptis fruticosa Salzm. Ex. Benth is a medicinal specie predominant in Bahia and Sergipe, but it is known just a few about the cultivation techniques of it. Thus, the goal of this research was to evaluate the *H. fruticosa* plants' behaviors cultivated in vases with different levels of evapotranspired water reposition during thirteen days. The experiment was made in greenhouse under randomized complete block design with four treatments (100, 75, 50 and 0% of water reposition). During this experimental period were made three evaluations to determine the water relative content, water potential and chloroplastid pigments content. In the end of the experiment was determined the total dry mass, leaf area, essential oil content and organic solute content. It was verified that there were not significant differences of the total dry mass, leaf area and essential oil content among the treatments. The water reposition 0% treatment presented the low values of water relative content, water potential, chlorophylls and carotenoids. The free amino acids' accumulation, proline, soluble proteins and soluble carbohydrates occurred according to the water availability decrease indicating the osmotic adjustment. Thereby the specie *H. fruticosa* revealed itself tolerant to water deficiency through little changes in the chlorophyll pigments content, organic solute accumulation, water potential decrease, maintenance of water content in leaves and not to present changes in dry matter.

Key words: Water stress. Osmotic adjustment. Chloroplastid pigments. Essential oil.

3. INTRODUÇÃO

A água constitui cerca de 80% a 95% da massa dos tecidos vegetais em crescimento, sendo necessária para manter os processos vitais das plantas. O excesso ou a falta de água acarreta injúrias e diminuição da produtividade das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2004). No processo de estresse por seca o conteúdo de água do solo é reduzido de tal modo que as plantas sofrem com a falta desta (LARCHER, 1986).

A deficiência hídrica provoca redução da fotossíntese e do crescimento, e como forma de resposta ao estresse imposto, diversos mecanismos bioquímicos, fisiológicos e anatômicos são acionados para evitar a perda de água. Entre e os conseqüentes danos acarretados pelo déficit hídrico, podem ser citados o fechamento estomático, redução da área foliar, aumento do crescimento das raízes e acúmulo de solutos compatíveis (PIMENTEL, 2004).

A redução do potencial hídrico nas plantas tem sido um processo chave de tolerância ao estresse, pois dificulta a perda de água para o solo. Os solutos orgânicos são referidos como os principais responsáveis pela osmorregulação de plantas estressadas, uma vez que estes solutos podem se acumular em grandes quantidades sem interferir nas atividades enzimáticas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Funções de proteção de estruturas sub-celulares contra radicais livres, alteração do pH e temperatura têm sido elucidadas como consequência do acúmulo destes solutos em plantas submetidas à estresse hídrico (HARE; CRESS, 1997, APEL; HIRT, 2004, NEPOMUCENO et al., 2001).

A deficiência hídrica também pode alterar a produção e composição dos metabólitos secundários, possivelmente por afetar processos críticos como fotossíntese, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, entretanto, as possíveis alterações destes metabólitos durante o déficit hídrico serão dependentes do tempo de exposição e grau do estresse, como também da resposta particular de cada espécie (GOBO-NETO; LOPES, 2007). Em plantas medicinais tem sido relatada a influência da disponibilidade água nas características dos óleos essenciais produzidos, demonstrando que tanto condições hídricas adequadas quanto à deficiência hídrica severa são capazes de aumentar a produção destes metabolitos secundários em plantas de interesse. (SILVA et al., 2002, MARQUES et al., 2009, LOPES et al., 2011). A procura de

plantas produtoras de metabólitos secundários associados com a atividade medicinal é crescente, contudo, apesar dos estudos relacionados com o cultivo serem realizados, informações sobre as exigências hídricas deste grupo de plantas ainda são incipientes (LOPES et. al, 2011).

Desta forma levando-se em consideração que a disponibilidade hídrica exerce uma grande influência nos processos vitais da plantas alterando a sua produção, teor e composição de metabólitos secundários, o presente trabalho teve como objetivo testar a influência de diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada na produção de biomassa, área foliar, pigmentos cloroplastídicos, teor relativo de água, potencial hídrico, solutos orgânicos e teor de óleo essencial em mudas de *Hyptis fruticosa* a fim de caracterizar o comportamento e tolerância desta espécie diante das diferentes disponibilidades hídricas.

4. MATERIAL E METÓDOS

O trabalho foi realizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil, localizada a 12°16'00" de latitude sul e 38°58'00" de longitude oeste, apresentando altitude de 234 metros e temperatura média anual de 24°C.

As mudas de *Hyptis fruticosa* Salzm. ex. Benth foram obtidas através de estaquia conforme metodologia adaptada de Oliveira et al. (2011)(Figura 1). Para tanto, em maio de 2012 foram utilizadas quatro matrizes oriundas da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, para a obtenção das estacas, as quais foram coletadas no período da manhã, a partir de ramos apicais. As estacas tiveram suas folhas retiradas, deixando somente as quatro primeiras folhas superiores e foram transferidas para quatro bandejas de poliestireno expandido de 200 células preenchidas com substrato comercial (Plantmax®), em condições de telado e pulverização intermitente.



Figura 1. Mudanças da espécie *Hyptis fruticosa*, produzidas por estaquia em maio de 2012.

Após o enraizamento, em agosto de 2012, as mudas foram transferidas para vasos e irrigadas manualmente a cada dois dias e adubadas quinzenalmente com fertilizante NPK+Micronutrientes (Vitaplam) proporção 15-15-20-1,9 %.

O início da avaliação do efeito do estresse hídrico foi em maio de 2013 e teve duração de 13 dias.

Durante o período de experimento, foi quantificado o consumo de água para cada planta. Para tanto, três vasos com plantas foram irrigados até a saturação e após 72 horas foram novamente irrigados com um volume conhecido de água, coletando-se a água percolada. Por diferença foi determinada a média da água evapotranspirada no período de 72 horas. Foram estabelecidos níveis equivalentes a 100, 75, 50 e 0% da água evapotranspirada, sendo irrigadas manualmente a cada três dias. Devido a desuniformidade de crescimento da espécie *H. fruticosa*, as plantas foram separadas por tamanho, e o experimento foi montado em delineamento de blocos casualizados, com 3 blocos com 4 tratamentos contendo 10 vasos com uma planta cada.

Durante o período experimental foram feitas três avaliações do teor relativo de água foliar, potencial hídrico e teor dos pigmentos cloroplastídicos. A primeira avaliação foi feita antes da aplicação dos tratamentos e a última avaliação foi feita ao fim do experimento.

O teor relativo de água (TRA) de *H. fruticosa* foi mensurado às 9 horas da manhã em folhas totalmente expandidas localizadas no terço médio da planta. A determinação do TRA foi feita com base no peso de oito discos foliares (Matéria Fresca - MF, Túrgida - MT e Seca - MS), de acordo com a metodologia de Weatherley (1950), utilizando-se a seguinte fórmula: $TRA = [(MF - MS)/(MT - MS)] \times 100$.

O potencial hídrico foi determinado no período de ante-manhã, por meio de uma bomba de pressão (PMS 1000, PMS INSTRUMENT, Corvallis, EUA) (SCHOLANDER et al., 1965), em ramos coletados do terço médio das plantas.

Para determinação do teor dos pigmentos cloroplastídicos (clorofilas e carotenóides) foram retirados oito discos foliares de área conhecida. Quatro discos foliares foram imediatamente imersos em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), em tubos vedados e envoltos em papel alumínio. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por um período de aproximadamente 48 horas. Após a extração, a absorbância das amostras foi determinada à 480, 649 e 665 nm em espectrofotômetro. Os outros quatro discos foliares foram utilizados para a pesagem da massa seca em balança analítica. Após a coleta de dados foram feitos os cálculos dos teores de clorofilas e carotenóides, expressos em mg/g de massa seca, os quais foram realizados de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994) para extratos em DMSO.

No final do experimento (aos 13 dias) foi avaliada a massa seca da planta, para determinação da massa seca total, área foliar, solutos orgânicos e teor do óleo essencial de *H. fruticosa*.

Para a determinação da massa seca total as plantas foram coletadas e colocadas para secar em estufa à 60°C até peso constante. Em seguida foi pesada a massa seca das folhas, caule e raízes em balança analítica. A determinação da área foliar foi estimada por meio de regra de três simples, relacionando a massa seca e a área de 12 discos foliares com a biomassa seca total das folhas.

Para as determinações de solutos orgânicos, o extrato bruto foi obtido macerando-se 0,2 g de tecidos liofilizados de folhas, com 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA 0,1 mM. O homogeneizado foi filtrado em tecido de musselina e centrifugado a 12000 × g por 15 min. O sobrenadante foi armazenado em ultrafreezer e utilizado para as determinações de prolina livre, aminoácidos livres, proteínas solúveis e carboidratos solúveis.

A determinação de prolina livre foi feita colorimetricamente a 520 nm, em uma alíquota de 0,5 mL do extrato, utilizando-se a ninhidrina ácida como reagente específico e a prolina pura como padrão (BATES et al., 1973). Os aminoácidos livres totais foram quantificados colorimetricamente pelo método da ninhidrina

(570 nm), em uma alíquota de 0,1 mL do extrato, utilizando-se a glicina como padrão (YEMM; COCKING, 1955). A quantificação de proteínas solúveis totais foi feita colorimetricamente (595 nm) pelo método de ligação ao corante, em uma alíquota de 0,1 mL do extrato, utilizando-se a albumina de soro bovino pura como padrão (BRADFORD, 1976). Os carboidratos solúveis totais foram determinados colorimetricamente (490 nm) em uma alíquota de 0,1 mL do extrato, pelo método do fenol-ácido sulfúrico, utilizando-se a D-glucose como padrão (DUBOIS et al., 1956).

Após secagem das folhas em estufa à 60°C, foi quantificado o teor de óleos através da extração dos óleos essenciais em aparelho de destilação tipo Clevenger. O tempo de destilação foi de 3 horas. Após a destilação, o óleo juntamente com a água foi recolhido em um funil de separação, adicionando-se 30mL de diclorometano, por três vezes, e sulfato de sódio anidro para separação da água residual. Finalmente, o filtrado foi colocado em rotavapor para evaporar o diclorometano. O teor do óleo essencial foi quantificado pela massa de óleo em balança analítica e foi expresso em porcentagem massa/massa (g de óleo por 100 g de matéria seca).

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias das avaliações também foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para as médias dos níveis de água foram ajustados modelos de regressão polinomial.

5. RESULTADOS



Figura 02. Mudas da espécie *Hyptis fruticosa* submetidas a diferentes níveis de água aos 13 dias de experimento.

5.1 Teor relativo de água e Potencial hídrico

Os resultados mostram que o teor relativo de água (Figura 03) e o potencial hídrico (Figura 04) de *Hyptis fruticosa* foram influenciados pela disponibilidade hídrica, somente aos 13 dias.

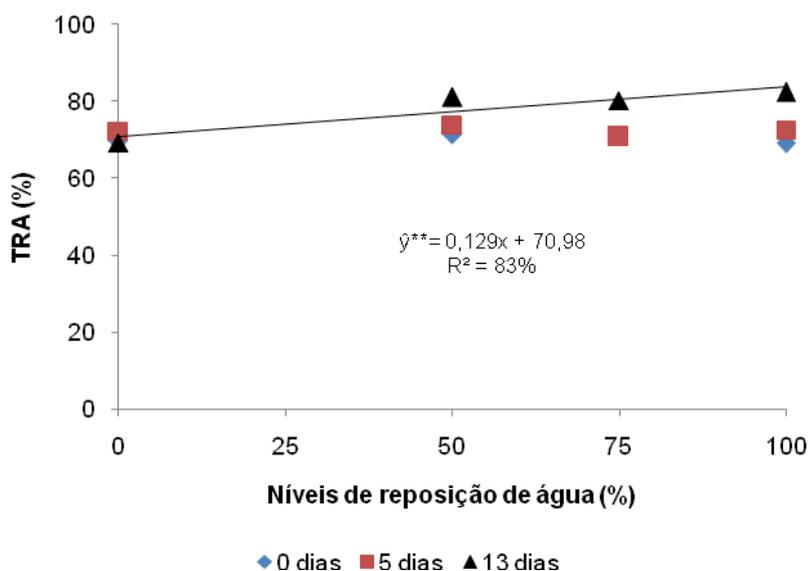


Figura 03. Valores médios de teor relativo de água (TRA) de espécie *Hyptis fruticosa* submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 0, 5 e 13 dias de experimento.

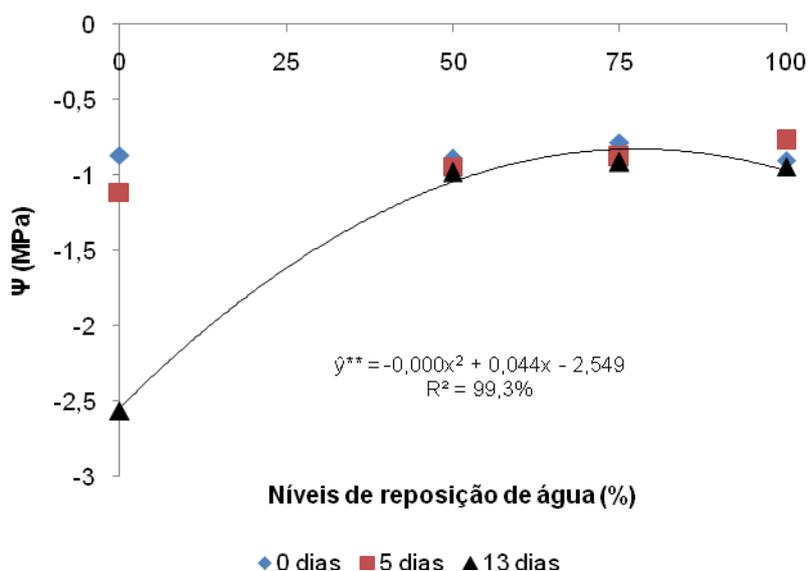


Figura 04. Valores médios de potencial hídrico (Ψ) de espécie *Hyptis fruticosa* submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 0, 5 e 13 dias de experimento.

Foi constatada pequena redução linear do TRA entre os tratamentos, com redução de 17% do TRA entre os tratamentos 100 e 0% de reposição de água (aos 13 dias). Comparando-se os dias de avaliação (0, 5, 13 dias) observa-se que nos tratamentos 50, 75, 100% de reposição de água ocorreu aumento no TRA, já para o tratamento 0% de reposição de água não foram verificadas diferenças entre os dias avaliados.

O potencial hídrico apresentou redução com a diminuição da disponibilidade de água, mas ao se comparar os dias de avaliação (0, 5, 13 dias), observa-se que somente no tratamento 0% de reposição de água houve redução do potencial hídrico. As plantas de *Hyptis fruticosa* submetidas a este tratamento apresentaram valor médio de potencial hídrico igual a -2,6 MPa.

5.2 Massa seca e Área foliar

Na tabela 01 são apresentados os valores médios de massa seca total (g) e área foliar (cm²) de *Hyptis fruticosa* submetida à deficiência hídrica. Os resultados mostram que nenhum dos tratamentos afetou estas variáveis em *H. fruticosa*.

Tabela 01. Valores médios de massa seca total (MST) e área foliar (AF) de espécie *Hyptis fruticosa* submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 13 dias de experimento.

TRATAMENTOS	MST (g)	AF (cm ²)
0%	3,989 a	26,229 a
50%	4,676 a	31,610 a
75%	4,563 a	31,024 a
100%	3,806 a	26, 899 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

5.3 Pigmentos cloroplastídicos

Os resultados mostram que os tratamentos e os dias de avaliação, influenciaram de forma independente o conteúdo de pigmentos cloroplastídicos.

Com base na média dos dias dentro de cada tratamento, foi possível observar que com a redução da disponibilidade hídrica, houve discreta redução no conteúdo de clorofila (Figura 05) e carotenóides (Figura 06) entre os tratamentos.

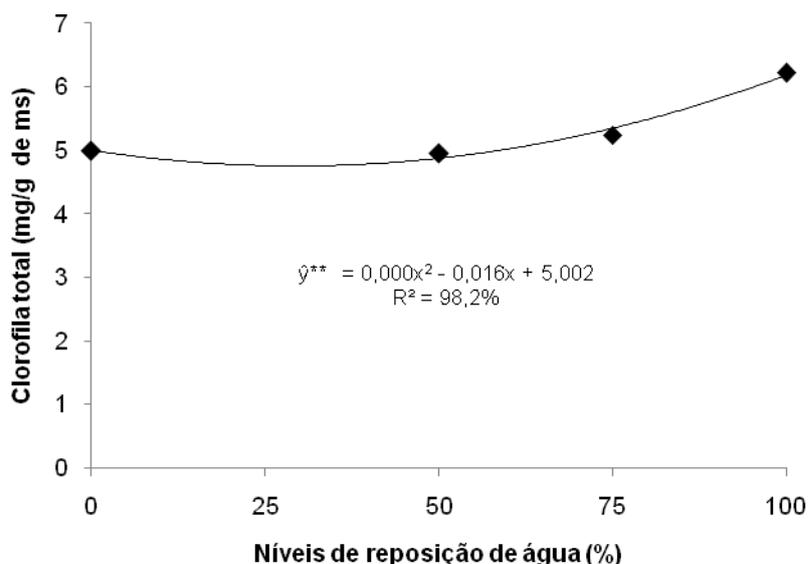


Figura 05. Valores médios de teor de clorofila total (mg/g de massa seca) de espécie *Hyptis fruticosa* submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada independente dos dias avaliados.

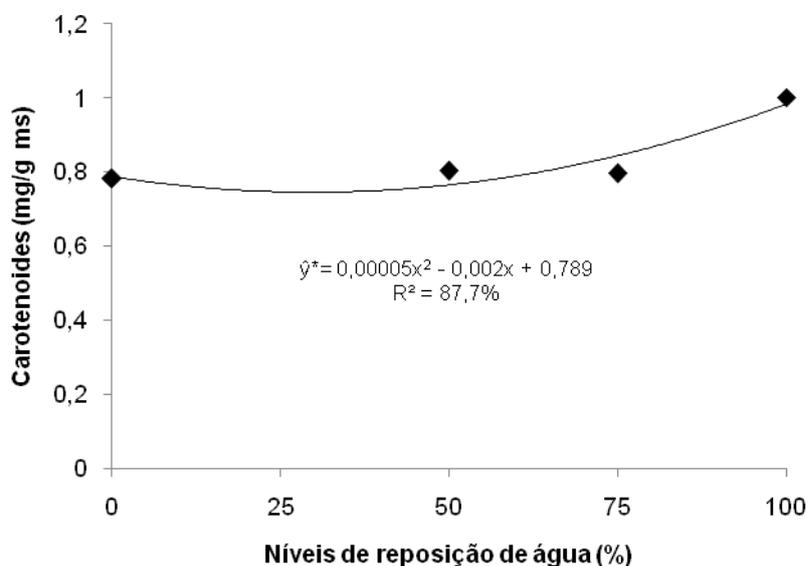


Figura 06. Valores médios de teor de carotenóides (mg/g de massa seca) de espécie *Hyptis fruticosa* submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada independente dos dias avaliados.

Com base nas médias dos tratamentos dentro de cada dia, o tempo incrementou o teor de clorofila (Tabela 02), que apresentou-se maior aos 5 e 13

dias. No entanto, não provocou alterações significativas no teor de carotenóides (Tabela 03).

Tabela 02. Valores médios do teor de clorofila total (mg/g de massa seca) de espécie *Hyptis fruticosa* aos 0, 5 e 13 dias de experimento.

AVALIAÇÃO	CLOROFILA
0 dias	3,719 a
5 dias	6,006 b
13 dias	5,239 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 03. Valores médios do teor de carotenóides (mg/g de massa seca) de espécie *Hyptis fruticosa* aos 0, 5 e 13 dias de experimento.

AVALIAÇÃO	CAROTENÓIDES
0 dias	0,623 a
5 dias	0,896 a
13 dias	0,872 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.4 Solutos orgânicos

Os níveis de reposição de água apresentaram influência significativa nos solutos orgânicos de espécie *Hyptis fruticosa*, como pode ser observado nas figuras 07, 08, 09, e 10..

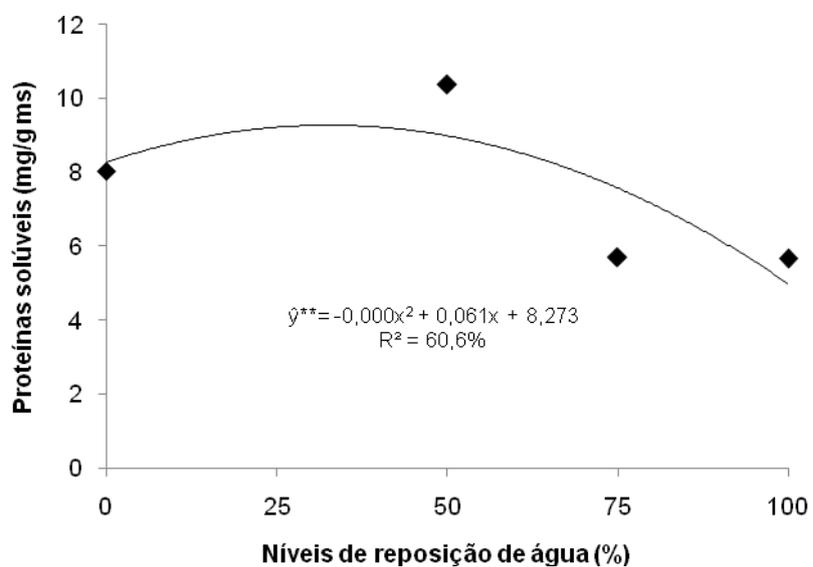


Figura 07. Valores médios de proteínas solúveis totais (mg/g de massa seca) de espécie *Hyptis fruticosa* submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 13 dias de experimento.

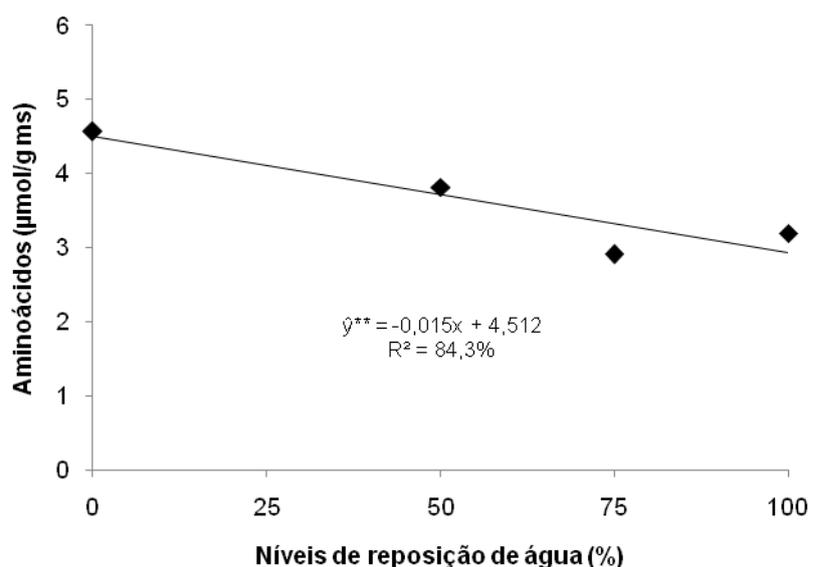


Figura 08. Valores médios de aminoácidos ($\mu\text{mol/g}$ de massa seca) de espécie *Hyptis fruticosa* submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 13 dias de experimento.

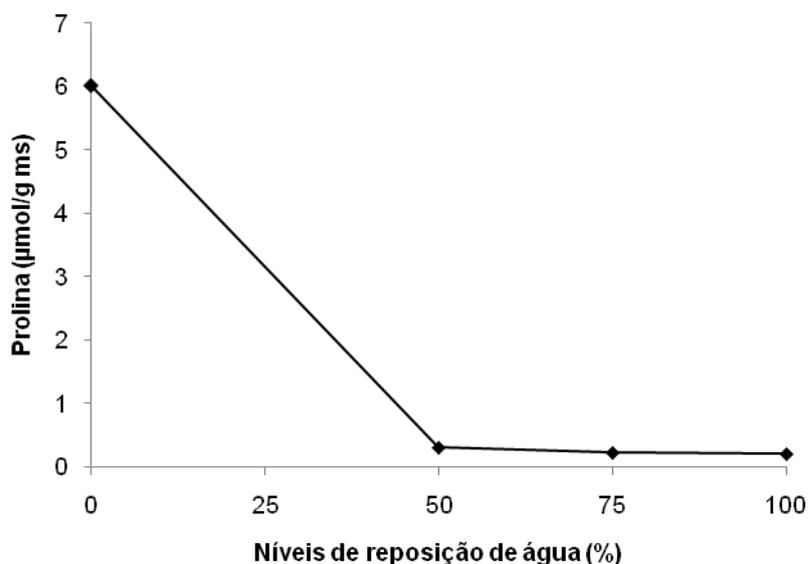


Figura 09. Valores médios de prolina ($\mu\text{mol/g}$ de massa seca) de espécie *Hyptis fruticosa* submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 13 dias de experimento.

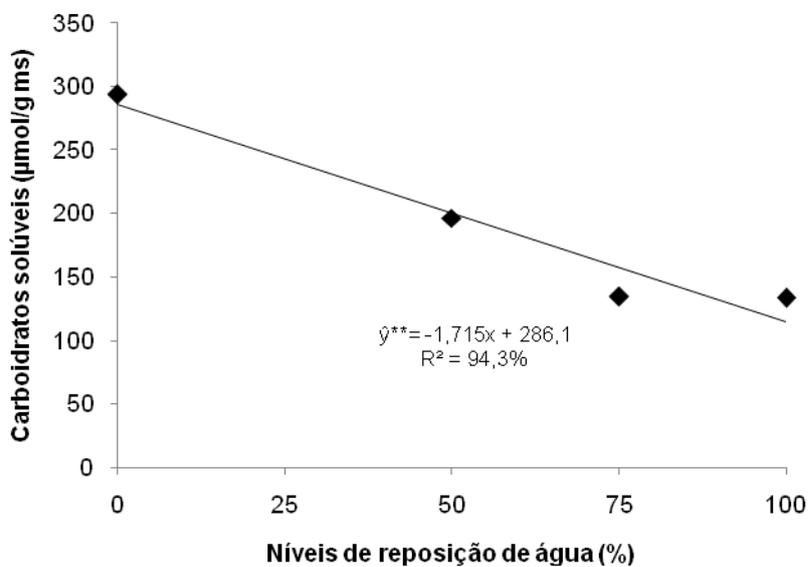


Figura 10. Valores médios de carboidratos solúveis totais ($\mu\text{mol/g}$ ms) de espécie *Hyptis fruticosa* submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 13 dias de experimento.

Em *H. fruticosa*, a disponibilidade hídrica influenciou significativamente o teor de proteínas solúveis (Figura 05), aminoácidos (Figura 06), prolina (Figura 07) e carboidratos solúveis (Figura 08). Todos os solutos orgânicos apresentaram

acréscimos com a diminuição dos níveis hídricos. Verifica-se que os maiores incrementos de prolina (2.692,5%), carboidratos (119,8%) e aminoácidos (43,1%) ocorreram em plantas do tratamento 0% de reposição de água, no entanto, o maior incremento no teor de proteínas (41,7%) ocorreu no tratamento 50% de reposição de água.

5.5 Teor de óleo essencial

A deficiência hídrica não afetou a produção de óleo essencial em *H. fruticosa* (Tabela 04).

Tabela 04. Valores médios de teor de óleo essencial (%) de espécie *Hyptis fruticosa* submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 13 dias de experimento.

TRATAMENTOS	TEOR DE ÓLEO (%)
0%	0,443 a
50%	0,403 a
75%	0,413 a
100%	0,332 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

6. DISCUSSÃO

A duração do estresse hídrico foi limitada à 13 dias para evitar a morte das plantas do tratamento 0% de reposição que já apresentavam-se em estágio de senescência.

6.1 Teor relativo de água e Potencial hídrico

A capacidade para suportar mudanças de hidratação varia muito entre as espécies. Nas plantas vasculares o conteúdo de água muda muito em curtos períodos de tempo (espécies hidrolábeis), em outras a variação é pequena devido a reservas internas, sistemas radiculares profundos, e forte controle de transpiração (espécies hidroestáveis) (TERRADAS, 2001).

Apesar da deficiência hídrica ter provocado pequenas variações no TRA entre os tratamentos, esta não reduziu o grau de hidratação das folhas de *Hyptis fruticosa* em nenhum dos tratamentos de déficit hídrico. Mas de forma diferente, a grande redução do potencial hídrico em plantas do tratamento 0% de reposição de água apresentou-se como mecanismo de resposta ao estresse hídrico. A redução do potencial hídrico associada a um possível controle estomático pode ter contribuído para reduzir a perda de água e manter o status hídrico da espécie *H. fruticosa* em condições severas de deficiência hídrica. De acordo com Fioreze et al. (2011), a manutenção do TRA deve ser considerada como característica de interesse no desenvolvimento de materiais adaptados à condições de restrição hídrica.

Assim como em *H. fruticosa*, plantas de *Erythrina velutina* submetidas a 100, 75, 50 e 25% da capacidade de campo não apresentaram alterações no TRA e potencial hídrico antemanhã dentro dos tratamentos (SILVA et al., 2010). Resultados semelhantes também foram observados em genótipos de caupi (*Vigna unguiculata*) cultivados em campo quando submetidas a 100, 82, 44 e 0% da necessidade de irrigação da cultura (ETm) (PIMENTEL et al., 2002). Porém, em cultivares de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica, a capacidade de manter o grau de hidratação ocorria até aos 8 dias de experimento e, após este período, apresentavam grandes reduções do TRA (GRAÇA et al., 2010).

De acordo com Fioreze et al. (2011), o genótipo de soja CD 217 mostrou-se mais sensível ao dessecamento por apresentar maior redução do TRA durante o déficit hídrico e menor valor de TRA após a reidratação. Os autores sugeriram que possivelmente o menor controle estomático das perdas de água em resposta a deficiência hídrica nesse genótipo, estaria associada com esse comportamento.

As plantas de *Hyptis fruticosa* submetidas ao tratamento 0% de reposição apresentaram potencial hídrico (-2,56 MPa) bastante semelhantes ao da espécie arbórea mogno africano (*Khaya ivorensis*) submetida a total deficiência hídrica (-2,66 MPa) por 14 dias. Porém, nesta espécie lenhosa os baixos valores de potencial hídrico vieram acompanhados de redução do TRA (32%), o que acarretou grandes reduções nas taxas de assimilação líquida de carbono (90%), condutância estomática (95%) e na razão entre concentração intercelular e ambiental de CO₂ (37%) (ALBUQUERQUE et al., 2013). Em comparação com a espécie mogno africano, *Hyptis fruticosa* apresentou-se mais tolerante a deficiência hídrica através da maior capacidade de manutenção do conteúdo de água, o que está associada também, com uma provável maior preservação das taxas fotossintéticas nesta espécie.

6.2 Massa seca e Área foliar

O estresse hídrico é um dos fatores ambientais que afetam a produtividade da agricultura causando consideráveis reduções no crescimento, biomassa e área foliar de plantas medicinais e aromáticas (SILVA et al., 2002, SHARAFZADEH; ZARE, 2011). Durante o estresse hídrico a produção de biomassa pode ser afetada devido a redução e/ou inibição da fotossíntese que deixa produzir os fotoassimilados necessários para o crescimento da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A massa seca total e área foliar de *Hyptis fruticosa*, no entanto, não apresentaram reduções significativas em função da diminuição da disponibilidade de água, o que possivelmente pode estar relacionado com o tempo de imposição da deficiência hídrica. O trabalho de Carvalho et al. (2012) corrobora esta idéia, pois em um período de imposição da deficiência hídrica maior (60 dias), foi observado comportamento distinto em espécie do mesmo gênero. De acordo com os autores, *Hyptis pectinata* quando submetida ao tratamento 25% da capacidade de campo apresentava redução da altura (18,3%) e da produção de massa seca da parte aérea (51,4%) aos 60 dias de regime hídrico.

É possível observar na literatura que tanto o estresse hídrico de longa duração quanto o de curta duração tem a capacidade de promover a redução do acúmulo de biomassa em plantas medicinais.

Em trabalho de Silva et al. (2002) foi verificado que a deficiência hídrica severa diminuía o crescimento, a produção de biomassa fresca e seca de *Melaleuca aternifolia* aos 106 dias de experimento. Porém apesar da disponibilidade de água ter afetado a produção de biomassa, estes autores não verificaram redução da área foliar nesta espécie.

Carvalho et al. (2003) estudando efeito da disponibilidade hídrica observou que no tratamento 50% da capacidade de campo, a espécie artemísia (*Tanacetum parthenium*) apresentava os menores valores de altura e acúmulo de massa fresca aos 120 dias de experimento.

Marchese et al. (2010) observaram que a produção de biomassa de *Artemisia annua*, não era afetada até 38 horas de imposição da deficiência hídrica total, entretanto, após 62 horas já era possível observar redução da biomassa nesta espécie.

6.3 Pigmentos cloroplastídicos

Os pigmentos de plantas estão integralmente relacionados com as funções fisiológicas de folhas, desempenhando papéis importantes no crescimento das plantas, através da captação e transmissão da energia luminosa para a produção de fotoassimilados (ARUNYANARK et al. 2008). Segundo Loggini et al. (1999), a falta de mudanças no conteúdo e composição de pigmentos sob condições de seca indica a capacidade de conservação do aparelho fotossintético.

A disponibilidade hídrica pouco influenciou a produção de pigmentos cloroplastídicos em *H. fruticosa*, demonstrando comportamento tolerante ao déficit hídrico através da manutenção do conteúdo destes pigmentos. Similarmente, na espécie *Hyptis pectinata* durante a imposição do déficit hídrico, o conteúdo de clorofilas era mantido em níveis elevados por um grande período de tempo (45 dias) dentro dos tratamentos 75, 50 e 25% da capacidade de campo. Entretanto, aos 60 dias de estresse hídrico os tratamentos, tiveram o teor de clorofila total reduzido (CARVALHO et al., 2012).

Diferente ao observado em *H. fruticosa*, em estudo de Carvalho e et al. (2003) com a espécie *Tanacetum parthenium* (artemísia) foi verificado que o tempo (120 dias) promovia a redução no teor relativo de clorofila dentro dos tratamentos, 100, 90, 70 e 50%, o que indicaria tendência à senescência. No

entanto, na deficiência hídrica mais severa (50%) o teor relativo de clorofilas era superior.

Espécies sensíveis ao estresse hídrico apresentam a redução no conteúdo de pigmentos cloroplastídicos, sendo que esta redução pode estar relacionada com a danificação da cadeia transportadora de elétrons (LOGGINI et al., 1999).

Durante o estresse hídrico a degradação de pigmentos ocorre devido à formação de espécies reativas de oxigênio. Plantas tolerantes têm a capacidade de produzir moléculas antioxidantes evitando a degradação de proteínas, pigmentos e membranas celulares. A síntese de prolina, glutatona, ascorbato, α -tocoferol, flavonóides e carotenóides e das enzimas antioxidantes peroxidases, superóxido dismutase e catalases têm sido relatada como responsável por evitar ou atenuar os danos oxidativos (EGERT; TEVINE, 2002).

6.4 Solutos orgânicos

Os solutos orgânicos em *H. fruticosa* foram altamente acumulados com a deficiência hídrica. Acredita-se que a acumulação de osmólitos no citoplasma reduz o potencial de água celular a baixo do potencial hídrico do solo, permitindo que a água entre na célula (HARE; CRESS, 1997). Desta forma, o ajustamento osmótico permite o aumento da capacidade das espécies tolerarem períodos curtos de seca (NEPOMUCENO et al., 2001). No tratamento 0% de reposição de água o acúmulo de solutos orgânicos ocorreu em maior magnitude. Isto foi acompanhado de potencial hídrico baixo (-2,56 MPa) característicos de plantas sob estresse moderado. Somente neste tratamento foi possível observar o ajustamento osmótico possivelmente acarretado pelo maior acúmulo de solutos orgânicos, pois os demais tratamentos não tiveram alterações significativas do potencial hídrico.

O aumento de solutos orgânicos em condições de deficiência tem sido detectado em inúmeras espécies, como por exemplo, em *Paspalum paniculatum* (MELO et al., 2007), *Holcus lanatus* (PEDROL et al., 2000), *Schizolobium amazonicum*, *Schizolobium parahyba* (CARVALHO et al., 2005), genótipo 55437 e BR1 de amendoim (PEREIRA et al., 2012).

O estresse hídrico pode acarretar a redução da fotossíntese restringindo o fornecimento de açúcares solúveis para o metabolismo da planta. Entretanto

como forma de manter os processos celulares, fontes de reservas de carbono (amido) podem ser convertidas açúcares solúveis para suprir as necessidades energéticas das plantas e para promover o ajuste osmótico (ROSA et al., 2009).

Segundo Melo et al. (2007), o acúmulo de carboidratos solúveis totais associado com o aumento de amido, indicaria que o aumento de carboidratos solúveis não ocorre a partir da interconvenção do amido e sim provavelmente pela paralisação do crescimento ou redistribuição de reservas associadas à manutenção da efetividade da fotossíntese durante a deficiência hídrica. No entanto, em situações de redução brusca da fotossíntese, a redução de açúcares solúveis estaria associada ao consumo destes metabólitos para a manutenção da sobrevivência durante o estresse hídrico.

Em condições de estresse osmótico o acúmulo dos aminoácidos valina, tirosina, serina, fenilalanina, glicina, glutamina e glutâmico tem sido sugerido como resultado do catabolismo de proteínas e/ou re-alocação do nitrogênio causado pela a inibição do crescimento (KEMPA et al., 2008). Porém, como houve aumento de proteínas e não houve redução significativa do acúmulo de massa seca, a concentração de aminoácidos em folhas de *H. fruticosa* está mais relacionada com a "síntese de novo" destes metabólitos que do catabolismo de proteína e/ou re-alocação do nitrogênio causado pela a inibição do crescimento.

6.5 Teor de óleo essencial

A disponibilidade hídrica tem a capacidade de alterar a produção de metabólitos secundários devido a alterações da fotossíntese, mobilização de reservas, crescimento e expansão foliar (GOBO-NETO; LOPES et al., 2007). Durante o período de aplicação dos tratamentos o teor de óleo não foi afetado estatisticamente pela deficiência hídrica. Talvez o tempo de imposição do déficit hídrico não tenha sido o suficiente para diferenciar os tratamentos hídricos, uma vez que o efeito da falta de água sobre a produção de metabólitos secundários está relacionado com o grau e duração do estresse hídrico (GOBO-NETO; LOPES, 2007).

Marchese et al. (2010) estudando o efeito de 14, 38, 62 e 86 horas de suspensão da irrigação em *Artemisia annua* (asteraceae) verificou que aumento

do tempo de imposição da deficiência hídrica promovia o aumento do conteúdo foliar de artemisinina.

Diversas espécies da família lamiaceae apresentam aumento significativo da produção de óleo essencial em condições de deficiência hídrica. Este efeito pode ser observado na produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* (MEIRA et al., 2013), *Ocimum basilicum*, (KHALID, 2006, EKREN, et al. 2012) e *Ocimum americanum* (KHALID, 2006). Carneiro et al. (2010) investigando o efeito da pluviosidade em espécie da mesma família detectaram que os meses de menor precipitação ocorriam a maior produção de óleo essencial em *Plectranthus amboinicus*.

O aumento da síntese de isoprenóides, fenóis ou alcalóides durante o estresse hídrico têm sido sugeridos devido a maior oferta de agentes redutores (NADPH) para as vias metabólicas secundárias, acarretada pela diminuição da atividade do ciclo de Calvin (SELMAR; KLEINWACHTER, 2013). Por outro lado, segundo Hare e Cress (1997) o aumento da proporção NADP/NADPH acarretada pela síntese da prolina poderia aumentar a atividade da via das pentoses, o que disponibilizaria maior quantidade de precursores para a produção de metabólitos secundários durante o estresse.

7. CONCLUSÕES

Durante o período experimental a espécie *H. fruticosa* mostrou-se tolerante á deficiência hídrica de curto prazo.

O estresse hídrico de curto prazo não afetou a produção de óleo essencial de *H. fruticosa*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373–399, 2004.
- ARUNYANARK, A., et al. Chlorophyll stability is an indicator of drought tolerance in peanut. **Journal Agronomy & Crop Science**, v.194, p.113-125, 2008.

- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and soil**, v.39, p.205-207, 1973.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- CARNEIRO, F. B. et al. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.600-606, ago.-set., 2010.
- CARVALHO, L. M. et al. Disponibilidade de água no solo e crescimento de artemísia. **Horticultura brasileira**, v. 21, n. 4, p. 726-730, out.-dez., 2003.
- CARVALHO, C. J. R.. Respostas de plantas de *Schizolobium amazonicum* [S. *parahyba* var. *amazonicum*] E *Schizolobium parahyba* [*Schizolobium parahybum*] À deficiência hídrica. **R. Árvore**, v.29, n.6, p.907-914, 2005.
- CARVALHO, J. S. B.; MARTINS, J. D. L.; MOREIRA, K. A. Respostas fisiológicas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. ao estresse hídrico. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.12, n. 2, 2012.
- DE ALBUQUERQUE, M. P. F. et al. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno africano submetidas a deficit hídrico e reidratação. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48, n.1, p.9-16, jan., 2013.
- DUBOIS, M., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- EGERT, M.; TEVINI, M. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). **Environmental and Experimental Botany**, v.48, p. 43-49, 2002.
- EKREN, S. et al. The effect of different irrigation water levels on yield and quality characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum* L.). **Agricultural Water Management**, v. 109, p.155-161, 2012.
- FIOREZE, S. L., et al. Comportamento de genótipos de soja submetidos a déficit hídrico intenso em casa de vegetação. **Revista Ceres**, v. 58, n.3, p. 342-349, mai.-jun., 2011.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2., p.374-381, 2007.
- GRAÇA, J. P., et al. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. **Brazilian Journal Plant Physiol.**, v.22, n.3, p.189-197, 2010.

- HARE, P. D.; CRESS, W. A.. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p.79-102, 1997.
- KEMPA, S., et al. A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. **PLoS ONE**, v.3, n.12, dec., 2008.
- KHALID, KH. A. Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). **International Agrophysics**, v. 20, p.289-296, 2006.
- LARCHER, Walter. **Ecofisiologia vegetal**. Sao Paulo: EPU, 1986. 319p.
- LOGGINI, B., et al. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. **Journal Plant Physiology**, v. 119, p. 1091-1099, mar., 1999.
- LOPES, O. D., et al. Determinação do coeficiente de cultura (Kc) e eficiência do uso de água do alecrim-pimenta irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.6, p.548-553, 2011.
- MARCHESE, J. A., et al. Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*Artemisia annua* L., Asteraceae). **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.22, n.1, n.1-9, 2010.
- MARQUES, P. A. A.; BERNADI FILHO, L.; SANTOS, A. C. P. Crescimento, produção de óleo essencial e trocas gasosas em orégano influenciados por diferentes lâminas de irrigação. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1888-1892, set., 2009.
- MEIRA, M. R., et al. Crescimento vegetativo, produção de fitomassa e de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob diferentes lâminas de irrigação **Ciência Rural**, v.43, n.5, p.779-785, mai., 2013.
- MELO, H. C., et al. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, v. 34, n.2, p.145-153, 2007.
- NEPOMUCENO, A. L., et al. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.23, p.12-18, nov.-dez., 2001.
- OLIVEIRA, L. M., et al. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v. 13, n.1, p.73-78, 2011.
- PEDROL, N.; RAMOS, P.; REIGOSA, M. J.. Phenotypic plasticity and acclimation to water deficits in velvet-grass: a long-term greenhouse experiment. Changes in leaf morphology, photosynthesis and stress-induced metabolites. **Journal Plant Physiology**, v. 157, p.383-393, 2000.

- PEREIRA, J. W. L., et al. Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 766-773, out/dez, 2012.
- PIMENTEL, C, et al. Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivados em campo. **Revista Universidade Rural**, Série. Ciências da Vida, v. 22, n.1, p.07-14, 2002.
- PIMENTEL, Carlos. **A Relação da Planta com a Água**. Rio de Janeiro: EDUR, 2004, 191p.
- ROSA, M., et al. Soluble sugars - Metabolism, sensing and abiotic stress. A complex network in the life of plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.4, n.5, 2009.
- SCHOLANDER, P. F. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v.14, p.339-346, 1965.
- SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. **Plant Cell Physiology**. v.54, n.6, p.817-826, 2013.
- SHARAFZADHER, S.; ZARE, M. Effect of drought stress on qualitative and quantitative characteristics of some medicinal plants from lamiaceae family: A Review. **Advances in Environmental Biology** v.5, n.8, p. 2058-2062, 2011.
- SILVA, S. R. S., et al. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.
- SILVA, E. C., et al. Growth evaluation and water relations of *Erythrina velutina* seedlings in response to drought stress. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.22, n.4, p. 225-233, 2010.
- TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 3.ed Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.
- TERRADAS, Jaume. **Ecologia de la vegetacion**: de la ecofisiologia de las plantas a la dinamica de comun idades y paisajes. Barcelona: Ediciones Omega, 2001. 703 p.
- WEATHERLEY, P. E. Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. **New Phytologist**, v.49, p.81-87, 1950.

WELLBURN, A. R.. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal Plant Physiology**, v.144, p.307-313, 1994.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of aminoacid with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

**CAPITULO II - ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS
EM *OCIMUM GRATISSIMUM* L. SOB DIFERENTES REGIMES
HÍDRICOS**

(Artigo a ser submetido à Revista Ciência Rural)

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM *OCIMUM GRATISSIMUM* L. SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS

RESUMO

Ocimum gratissimum Lindl. é uma espécie de grande importância farmacológica, porém, tem sido objeto de poucos estudos fisiológicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de plantas de *O. gratissimum* cultivadas em vasos e submetidas a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada durante o período de nove dias. O experimento foi realizado em telado sob delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (100, 75, 50 e 0% de reposição de água). Foram feitas três avaliações para determinação do teor relativo de água, potencial hídrico, trocas gasosas e teor de pigmentos cloroplastídicos. Ao fim do experimento foi determinada a massa seca total, área foliar, teor de óleo essencial e solutos orgânicos. Verificou-se que não houve diferenças significativas da massa seca total e área foliar entre os tratamentos. O tratamento 0% de reposição de água apresentou os menores valores de teor relativo de água, potencial hídrico, clorofilas e carotenóides. Houve redução da assimilação líquida de carbono, condutância estomática e transpiração com o aumento do déficit hídrico e aumento da concentração interna de CO₂. O acúmulo de aminoácidos livres, prolina, proteínas solúveis e carboidratos solúveis ocorreram de acordo com o aumento do déficit hídrico. O teor de óleo essencial aumentou com o incremento da disponibilidade hídrica. *O. gratissimum* mostrou-se sensível à deficiência hídrica através da grande redução do conteúdo de água das folhas e assimilação de carbono, no entanto, desenvolveu mecanismos de tolerância ao estresse hídrico por apresentar redução da transpiração, acúmulo de solutos orgânicos, grande redução do potencial hídrico e por não apresentar alterações da massa seca.

Palavras-chave: Estresse hídrico. Trocas gasosas. Pigmentos cloroplastídicos. Ajustamento osmótico. Óleo essencial.

METHABOLIC AND PHYSIOLOGIC CHANGES IN *OCIMUM GRATISSIMUM* L. UNDER DIFFERENT WATER REGIMES

ABSTRACT

Ocimum gratissimum Lindl. is a specie with a great pharmacologic importance, but, it has been goal of a few physiologic studies. Thereby, the goal of this research was to evaluate the behavior of the *O. gratissimum* plants cultivated in vases submitted in different evapotranspired water reposition during nine days. The experiment was made in greenhouse under randomized complete block design with four treatments (100, 75, 50 and 0% of water reposition). Three evaluations were made to determine the water relative content, water potential, gas exchanges and chloroplastid pigments content. In the end of the experiment was determine the total dry mass, leaf area, essential oil content and organic solute. It was verified that there were not significant difference in total dry mass and leaf area among the treatments. The water reposition 0% treatment presented the low values of water relative content, water potential, chlorophylls and carotenoids. There were a decrease of the net assimilation of carbon, stomatal conductance and transpiration with the water deficit increase and the CO₂ inside concentration increase. The free amino acids' concentration, proline, soluble proteins and soluble carbohydrates occurred according to the water deficit increase. The essential oil content increased with the water availability increment. *O. gratissimum* revealed itself sensitive and the water deficiency through the great decrease in the leaf water content and assimilation of carbon, however, it developed tolerance mechanisms to the water stress because it presents the transpirations decrease, organic solute accumulation, a great decrease of the water potential and not to presents dry mass changes.

Key words: Water stress. Gas exchanges. Chloroplastid pigments. Osmotic adjustment. Essential oil.

3. INTRODUÇÃO

Ocimum gratissimum L. é uma planta produtora de óleo essencial de grande potencial terapêutico. Seu óleo essencial rico em eugenol tem sido descrito por apresentar atividade antibacteriana (NAKAMURA et al. 1999) e antifúngica (LEMOS et al. 2005). Em plantas medicinais, o manejo da água tem sido uma das principais ferramentas para melhorar a produtividade e acúmulo de metabólitos secundários, pois a disponibilidade hídrica está intrinsecamente relacionada com a regulação destes processos (MARCHESE et al., 2010). O déficit hídrico é capaz de aumentar a produção de óleo essencial (SELMAR; KLEINWACHTER, 2013), porém, a produção de biomassa pode ser afetada devido a mecanismos de aclimatação para a conservação do conteúdo de água na planta durante a deficiência hídrica (CARVALHO et al. 2012).

Para evitar a perda de água pela transpiração as plantas diminuem a condutância estomática, o que reduz a disponibilidade de CO₂ intracelular, afetando a fotossíntese e, conseqüentemente, a acumulação de biomassa (PINHEIRO; CHAVES, 2011). Além do fechamento estomático, outros mecanismos de aclimatação são acionados para possibilitar que planta conserve seu conteúdo de água, dentre os quais: verticalização foliar, abscisão foliar, murcha das folhas, deposição lipídica foliar, redução na produção de biomassa das folhas, crescimento das raízes e redução do potencial hídrico pelo acúmulo de solutos orgânicos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Segundo Larcher (1986) a sobrevivência da planta está intimamente relacionada com a capacidade de prevenção da dessecação e com a capacidade de tolerar a dessecação sem danificar o protoplasma. Porém, em plantas pouco tolerantes o conteúdo de água é bastante reduzido ocorrendo danos funcionais através de alterações na temperatura e pH, formação de moléculas reativas de oxigênio, desnaturação de proteínas, degradação de clorofilas e rompimento de membranas celulares (APEL; HIRT, 2004, SOARES; MACHADO, 2007, ARUNYANARK et al., 2008, TAIZ; ZEIGER, 2013).

Deste modo, devido à disponibilidade hídrica exercer uma forte influência nos processos vitais da plantas alterando a sua produtividade, teor e composição de metabólitos secundários, o presente trabalho teve como objetivo testar a

influência de diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada no teor relativo de água, potencial hídrico, trocas gasosas, produção de biomassa, área foliar, pigmentos cloroplastídicos, solutos orgânicos e teor de óleo essencial em mudas de *O. gratissimum* L., a fim de caracterizar o comportamento e tolerância desta espécie diante das diferentes disponibilidades hídricas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil, localizada a 12°16'00" de latitude sul e 38°58'00" de longitude oeste, apresentando altitude de 234 metros e temperatura média anual de 24°C.

As mudas de *Ocimum gratissimum* L. foram produzidas em Janeiro de 2013, a partir de 2.400 sementes semeadas em 4 bandejas de poliestireno expandido (200 células) preenchidas com substrato comercial (Plantmax®) em condições de telado (Figura 11).



Figura 11. Mudanças da espécie *Ocimum gratissimum* L. produzidas por meio de sementes.

Após 10 dias da semeadura foi realizado o desbaste, mantendo a planta mais vigorosa, bem como a retirada de possíveis plantas competidoras. Após 20 dias da semeadura, quando as plantas alcançaram em torno de 10 cm de altura, as mudas de *O. gratissimum* foram transferidas para vasos plásticos, com capacidade para cinco litros, preenchidos com terra vegetal e mantidos em condições de telado. Após o transplante foi aplicada uma única adubação composta de substrato orgânico e esterco bovino (1:1). Durante o período de cultivo as mudas de *O. gratissimum* foram irrigadas diariamente.

O início da avaliação do efeito do estresse hídrico foi em maio de 2013 e teve duração de nove dias. Durante o período de experimento, foi quantificado o consumo de água para cada planta. Para tanto, três vasos com plantas foram irrigados até a saturação e após 72 horas foram novamente irrigados com um volume conhecido de água, coletando-se a água percolada. Por diferença foi determinada a média da água evapotranspirada no período de 72 horas. Foram estabelecidos níveis equivalentes a 100, 75, 50 e 0% da água evapotranspirada, os quais foram repostos a cada três dias. O experimento foi montado em delineamento em blocos casualizados, com 3 blocos com 4 tratamentos contendo 10 vasos com uma planta cada.

Durante o período experimental foram feitas três avaliações do teor relativo de água foliar, potencial hídrico, trocas gasosas e teor dos pigmentos cloroplastídicos. A primeira avaliação foi feita antes da aplicação dos tratamentos e a última avaliação foi feita ao fim do experimento.

O teor relativo de água (TRA) foi mensurado às 9 horas da manhã em folhas totalmente expandidas localizadas no terço médio da planta. A determinação do TRA foi feita com base no peso de oito discos foliares (Matéria Fresca - MF, Túrgida - MT e Seca - MS), de acordo com a metodologia de Weatherley (1950), utilizando-se a seguinte fórmula: $TRA = [(MF - MS)/(MT - MS)] \times 100$.

O potencial hídrico foliar das mudas de *Ocimum gratissimum* foi determinado no período de ante-manhã, por meio de uma bomba de pressão (PMS 1000, PMS INSTRUMENT, Corvallis, EUA) (SCHOLANDER et al., 1965), em folhas totalmente expandidas coletados do terço médio das plantas.

A avaliação das trocas gasosas foi feita entre 8:00 e 9:30 da manhã por meio de um analisador de gás a infravermelho, IRGA (ADC, modelo LCI, Hoddesdon, UK) com fonte de luz acoplada de $1.400 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As taxas de assimilação líquida de carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a concentração interna de CO_2 no mesófilo (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) foram mensuradas sob concentração de CO_2 , temperatura e vapor de H_2O do ambiente do local de estudo.

Para determinação do teor dos pigmentos cloroplastídicos (clorofilas e carotenóides) foram retirados oito discos foliares de área conhecida. Quatro

discos foliares foram imediatamente imersos em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), em tubos vedados e envoltos em papel alumínio. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por um período de aproximadamente 48 horas. Após a extração, a absorbância das amostras foi determinada á 480, 649 e 665 nm em espectrofotômetro. Os outros quatro discos foliares foram utilizados para a pesagem da massa seca em balança analítica. Após a coleta de dados foram feitos os cálculos dos teores de clorofilas e carotenóides, expressos em mg/g de massa seca, os quais foram realizados de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994) para extratos em DMSO.

No final do experimento (aos nove dias) foi avaliada a massa seca das plantas, para determinação da massa seca total, área foliar, e os teores de solutos orgânicos e óleo essencial de *O. gratissimum*.

Para a determinação da massa seca total as plantas foram coletadas e colocadas para secar em estufa à 60°C até peso constante. Em seguida foi pesada a massa seca das folhas, caule e raízes em balança analítica. A determinação da área foliar foi estimada por meio de regra de três simples, relacionando a massa seca e a área de 12 discos foliares com a biomassa seca total das folhas.

Para as determinações de solutos orgânicos, o extrato bruto foi obtido macerando-se 0,2 g de folhas liofilizadas, com 6 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA 0,1 mM. O homogeneizado foi filtrado em tecido de musselina e centrifugado a 12000 × g por 15 min. O sobrenadante foi armazenado em ultra freezer e utilizado para as determinações de prolina livre, aminoácidos livres, proteínas solúveis e carboidratos solúveis.

A determinação de prolina livre foi feita colorimetricamente a 520 nm, em uma alíquota de 0,5 mL do extrato, utilizando-se a ninhidrina como reagente específico e a prolina pura como padrão (BATES et al., 1973). Os aminoácidos livres totais foram quantificados colorimetricamente pelo método da ninhidrina (570 nm), em uma alíquota de 0,1 mL do extrato, utilizando-se a glicina como padrão (YEMM; COCKING, 1955). A quantificação de proteínas solúveis totais foi feita colorimetricamente (595 nm) pelo método de ligação ao corante, em uma alíquota de 0,1 mL do extrato, utilizando-se a albumina de soro bovino pura como padrão (BRADFORD, 1976). Os carboidratos solúveis totais foram determinados

colorimetricamente (490 nm) em uma alíquota de 0,1 mL do extrato, pelo método do fenol-ácido sulfúrico, utilizando-se a D-glucose como padrão (DUBOIS et al., 1956).

Após secagem das folhas em estufa à 60°C, foi quantificado o teor de óleos através da extração dos óleos essenciais em aparelho de destilação tipo Clevenger. O tempo de destilação foi de 3 horas. Após a destilação, o óleo juntamente com a água foi recolhido em um funil de separação, adicionando-se 30mL de diclorometano, por três vezes, e sulfato de sódio anidro para separação da água residual. Finalmente, o filtrado foi colocado em rotavapor para evaporar o diclorometano. O teor do óleo essencial foi quantificado pela massa de óleo em balança analítica e foi expresso em porcentagem massa/massa (g de óleo por 100 g de matéria seca).

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias das avaliações também foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para as médias dos níveis de água foram ajustados modelos de regressão polinomial.

5. RESULTADOS



Figura 12. Mudas da espécie *Ocimum gratissimum* L. submetidas a diferentes níveis de água aos 9 dias de experimento.

5.1 Teor relativo de água e Potencial hídrico

Os resultados mostraram que a deficiência hídrica provocou redução linear do teor relativo de água (Figura 13) de *Ocimum gratissimum* logo aos 5 dias de experimento. Foi observado aos 9 dias, redução do TRA em cerca de 53% entre os tratamentos 0% e 100% de reposição de água.

Para o potencial hídrico observou-se que entre 0 e 5 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos, e que aos 9 dias ocorreu uma redução linear, sendo que o tratamento 0% de reposição de água apresentou menor valor médio de -3,7 MPa (Figura 14)

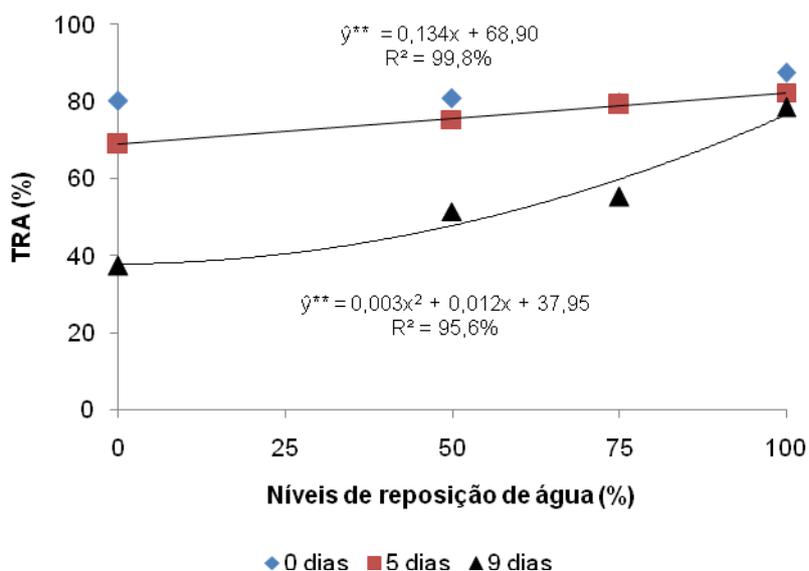


Figura 13. Valores médios de teor relativo de água (TRA) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evaporotranspirada aos 0, 5 e 9 dias de experimento.

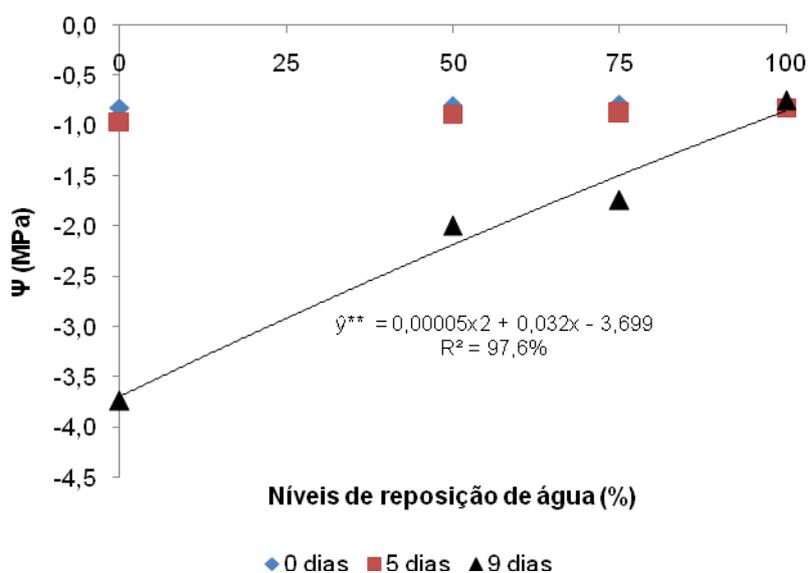


Figura 14. Valores médios de potencial hídrico (Ψ) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evaporotranspirada aos 0, 5 e 9 dias de experimento.

5.2 Massa seca e Área foliar

Na figura 3, são apresentados os valores médios de massa seca total (g) e área foliar (cm²) das plantas de *O. gratissimum* submetida à deficiência hídrica. Os resultados mostram que nenhum dos tratamentos afetou estas variáveis em *O. gratissimum*.

Tabela 05. Valores médios de massa seca total (MST) e área foliar (cm²) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 9 dias de experimento.

TRATAMENTOS	MST (g)	AF (cm ²)
0%	16,904 a	126,9 a
50%	17,904 a	177,0 a
75%	20,383 a	185,4 a
100%	18,090 a	175,5 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

5.3 Trocas gasosas

A disponibilidade de água e o tempo apresentaram influência significativa na assimilação líquida de carbono (Figura 15), condutância estomática (Figura 16), transpiração (Figura 17) e concentração interna de CO₂ (Figura 18) de *Ocimum gratissimum*.

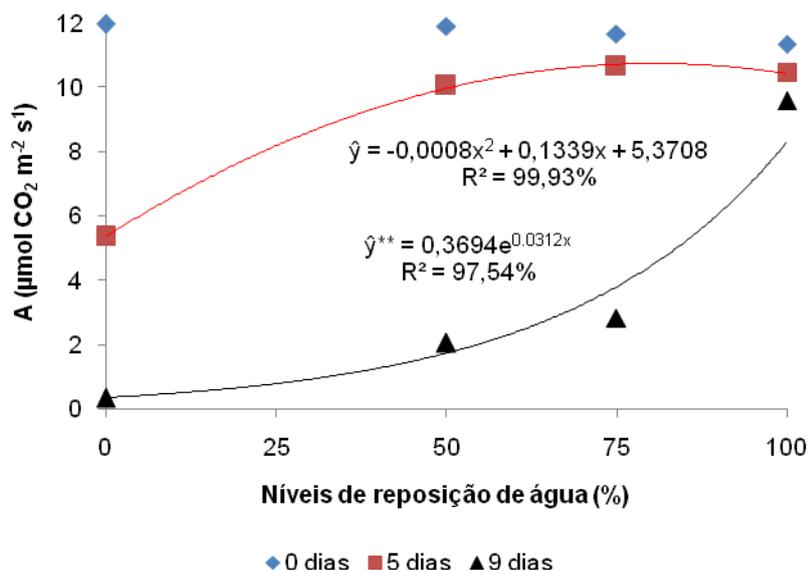


Figura 15. Assimilação líquida de carbono ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 0, 5 e 9 dias de experimento.

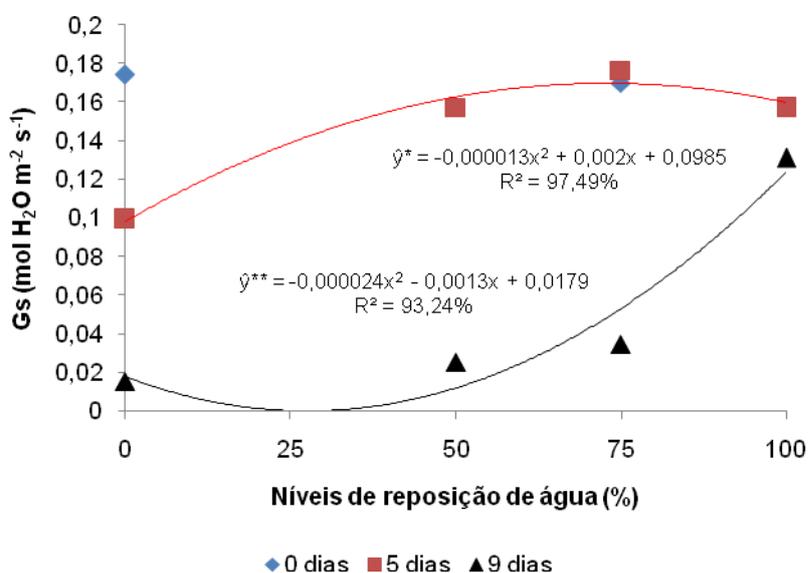


Figura 16. Condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 0, 5 e 9 dias de experimento.

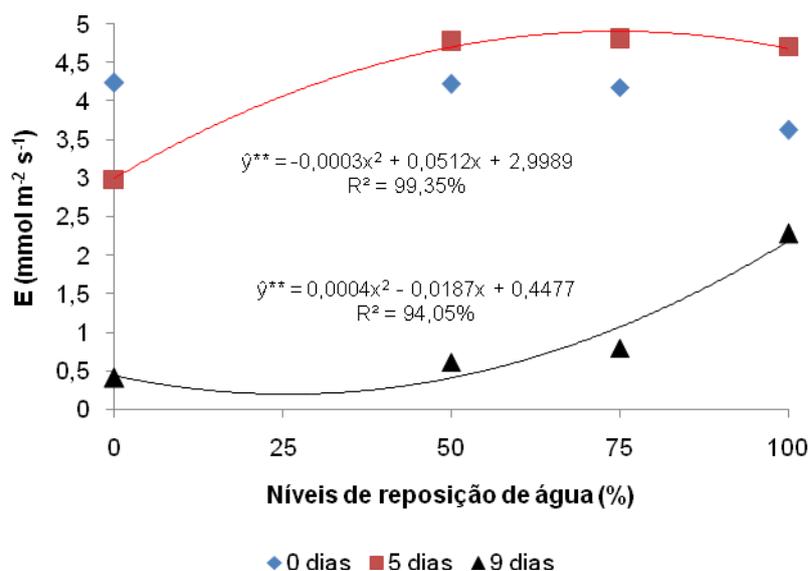


Figura 17. Transpiração (E) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 0, 5 e 9 dias de experimento.

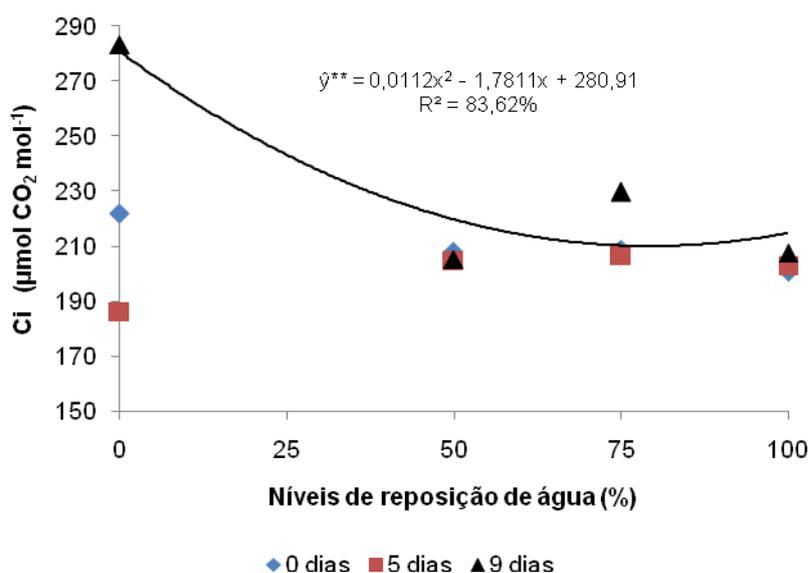


Figura 18. Concentração interna de CO_2 (C_i) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 0, 5 e 9 dias de experimento.

A assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (Gs), transpiração (E) apresentaram comportamento polinomial positivo a medida do aumento na disponibilidade hídrica aos 5 e 9 dias de experimento, porém, comportamento distinto foi detectado para a concentração interna de CO_2 , que apresentou correlação negativa aos nove dias. Dentre as variáveis relacionadas

com as trocas gasosas, a assimilação líquida de carbono foi a mais afetada pelo déficit hídrico, alcançando uma redução média de 97%.

Aos 5 dias plantas expostas ao tratamento 50 e 0% de reposição de água, apresentaram decréscimos da condutância estomática, transpiração e assimilação líquida de carbono em relação ao tratamento 100% de reposição de água evapotranspirada. Aos 9 dias o tratamento 75% também apresentou reduções destas variáveis em relação ao tratamento 100% de reposição de água evapotranspirada. Acréscimo da concentração interna de CO₂ somente ocorreu dentro do tratamento 0% de reposição de água. Sendo observado que neste tratamento as variáveis de trocas gasosas foram mais afetadas.

5.4 Pigmentos cloroplastídicos

Foi possível observar que os níveis de reposição de água e o tempo apresentaram influência significativa no conteúdo de clorofilas (Figura 19) e carotenóides (Figura 20) de *Ocimum gratissimum* somente aos 9 dias.

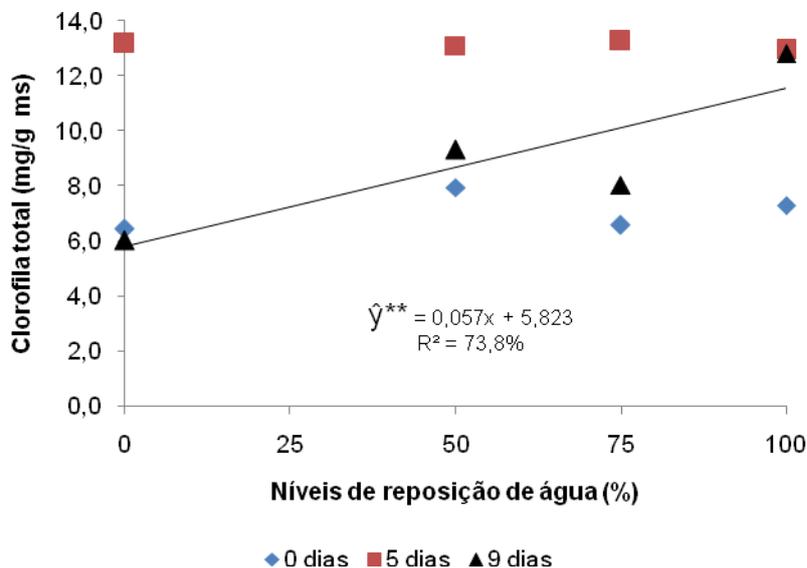


Figura 19. Valores médios de teor de clorofila total (mg/g de massa seca) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 0, 5 e 9 dias de experimento.

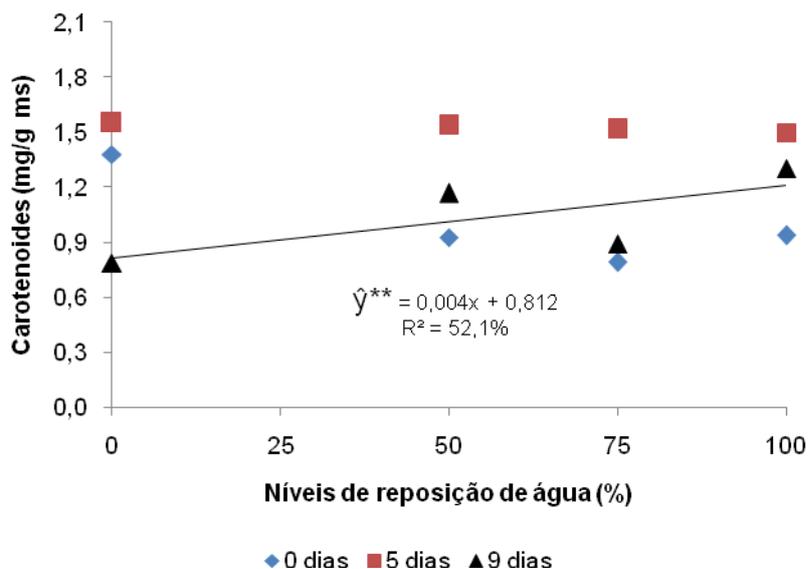


Figura 20. Valores médios de teor de carotenoides (mg/g de massa seca) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 0, 5 e 9 dias de experimento.

O conteúdo destes pigmentos entre os tratamentos tendeu a decrescer de acordo a diminuição dos níveis hídricos. Houve redução de 39,4% de carotenóides e 53% de clorofila em relação aos tratamentos com 100% e 0% de reposição de água. No entanto, levando-se em consideração os dias avaliados, não houve diminuição do conteúdo de clorofila dentro dos tratamentos com 100%, 75%, 50% e 0% de reposição de água. Foi observado que somente o tratamento 0% de reposição de água provocou redução no teor de carotenóides. Mas de forma geral, o teor dos pigmentos cloroplastídicos aumentou aos 5 dias e apresentou redução aos 9 dias.

5.5 Solutos orgânicos

Os níveis de reposição de água apresentaram influência significativa nos solutos orgânicos de espécie *Ocimum gratissimum*. O teor de proteínas solúveis (Figura 21), aminoácidos (Figura 22), prolina (Figura 23) e carboidratos solúveis (Figura 24), apresentaram acréscimos com a diminuição da disponibilidade hídrica.

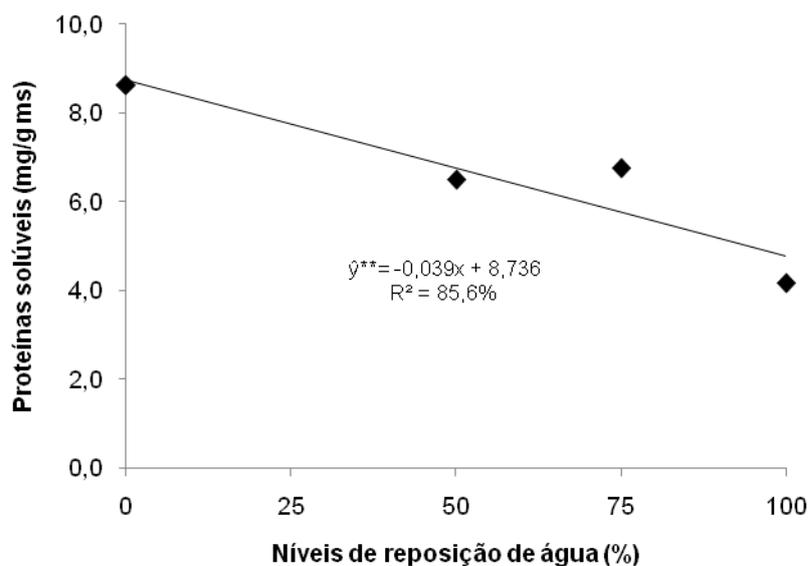


Figura 21. Valores médios proteínas solúveis totais (mg/g de massa seca) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 9 dias de experimento.

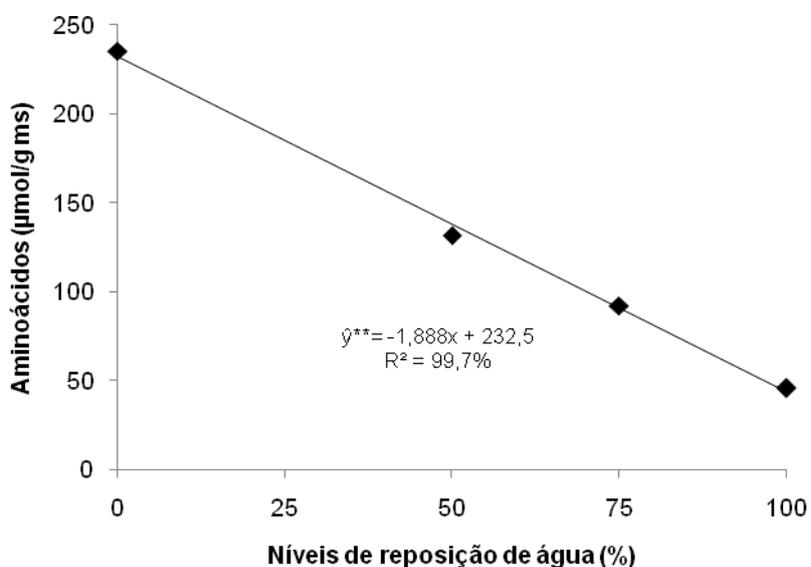


Figura 22. Valores médios de aminoácidos ($\mu\text{mol/g}$ de massa seca) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 9 dias de experimento.

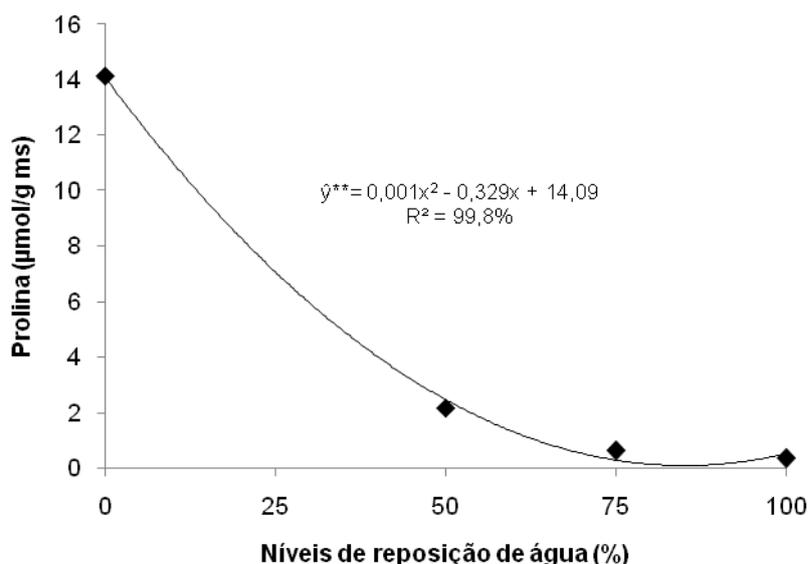


Figura 23. Valores médios de prolina ($\mu\text{mol/g}$ de massa seca) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 9 dias de experimento.

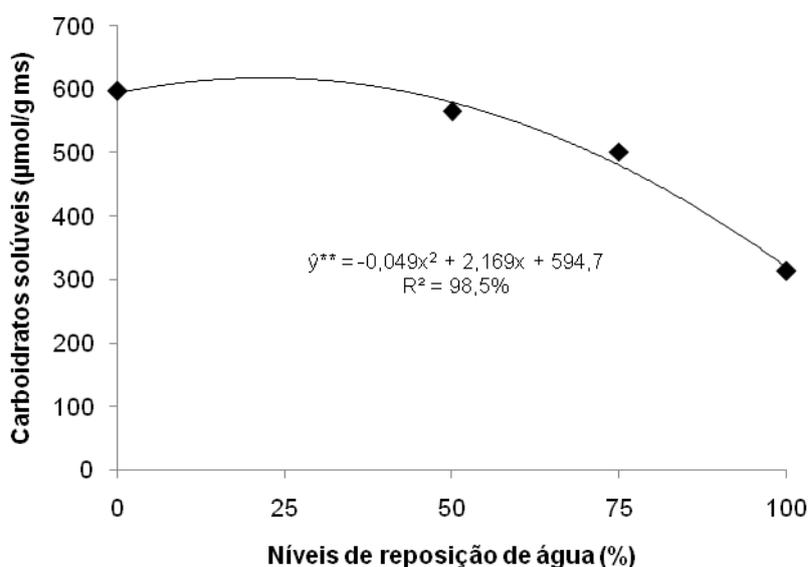


Figura 24. Valores médios de carboidratos solúveis totais ($\mu\text{mol/g}$ de massa seca) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 9 dias de experimento.

Verifica-se que a produção de todos os metabólitos em *O. gratissimum* foi superior em plantas submetidas ao tratamento 0% de reposição de água, o incremento maior ocorreu com a prolina (3.768,0%), aminoácidos (413,4%), proteínas (106,7%) e carboidratos (90,5%), respectivamente.

5.6 Teor de óleo essencial

Uma pequena redução polinomial (23%) foi observada no teor de óleo essencial (Figura 25) de *O. gratissimum* com a imposição do déficit hídrico, assim esta espécie apresentou melhor produção de óleo no tratamento 100% de reposição de água.

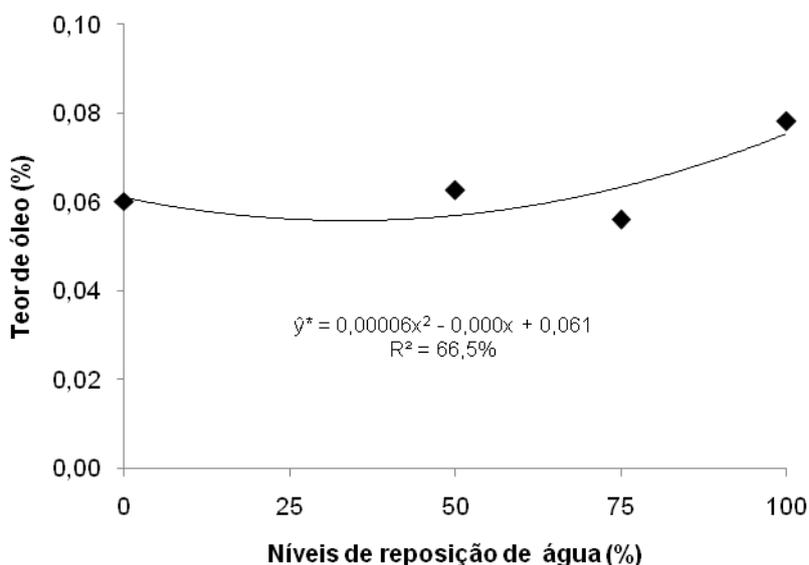


Figura 25. Valores médios de óleo essencial (%) de espécie *Ocimum gratissimum* L. submetida a diferentes níveis de reposição de água evapotranspirada aos 9 dias de experimento.

6. DISCUSSÃO

A duração do estresse hídrico foi limitada à 9 dias para evitar a morte das plantas do tratamento 0% de reposição que já apresentavam-se em estágio de senescência.

6.1 Teor relativo de água e Potencial hídrico

O status hídrico das plantas pode ser determinado pela quantificação do teor relativo de água e potencial hídrico nas folhas e, a avaliação destes dois parâmetros em conjunto, serve como indicativo do grau de hidratação e tolerância de plantas submetidas à deficiência hídrica. O TRA e o potencial hídrico em *O. gratissimum* foram altamente afetados pelo déficit hídrico, apresentando respectivamente valores mínimos característicos de deficiência hídrica severa de

37% e 3,7 MPa no tratamento com 0% de reposição de água. Porém, apesar do TRA apresentar reduções aos 5 dias de imposição de estresse, não houve reduções significativas do potencial hídrico até este período, devido à pequena redução do TRA ocorrida entre todos os tratamentos. Foi possível observar que, com um maior tempo de imposição do déficit hídrico houve um decréscimo maior no conteúdo de água em *O. gratissimum*, o que acabou resultando na grande redução do potencial hídrico entre os dois últimos dias de avaliação, corroborando que a redução do potencial hídrico possivelmente foi uma resposta da planta ao aumento do grau de estresse.

A redução do potencial hídrico e a desidratação celular são os primeiros efeitos fisiológicos acarretados pelo desequilíbrio de água na planta. Estes fatores alteram diretamente as propriedades bioquímicas e físicas nas células, capaz de provocar efeitos secundários, como, alteração da atividade metabólica, citotoxicidade iônica e a produção de espécies reativas de oxigênio (TAIZ; ZEIGER, 2013). O decréscimo do TRA e potencial hídrico são comuns em plantas estressadas pela deficiência de água, no entanto não é regra, pois tais alterações são dependentes do grau do déficit hídrico e da resistência intrínseca à espécie, cultivar e genótipo às condições de estresse.

Os valores de potencial hídrico encontrados para *O. gratissimum* foram semelhantes aos encontrados por Donoso et al (2011) em mudas de espécies arbóreas submetidas a suspensão de água durante 30 dias. Estes autores verificaram que em plantas com plena suspensão de água ocorreu redução do potencial hídrico, e que os valores médios alcançados foi igual a -3,9 e -3,6 MPa em *Quillaja saponaria* e *Cryptocarya Alba*, respectivamente. Porém, diferente da espécie *O. gratissimum* o TRA não apresentou grandes reduções nestas espécies (83,2 e 97%), demonstrando a maior capacidade de espécies lenhosas em relação as espécies herbáceas em manter a água em seus tecidos.

O TRA em para plantas de *O. gratissimum* submetidas a deficiência hídrica mais severa foi semelhante ao encontrado por Santos et al. (2012) em cultivares de trigo submetidas à suspensão de água no início do florescimento pelo período de dez dias, os menores valores encontrados foi para a cultivar CD111 em torno de 38%. Estes pesquisadores observaram a redução do TRA em função do déficit

hídrico para a cultivar CD111 aos 5 dias, percebendo que a redução do TRA ocorria posteriormente à redução da umidade gravimétrica do solo.

Catuchi et al. (2012) estudando respostas fisiológicas de cultivares de soja à adubação potássica sob diferentes regimes hídricos durante 25 dias, também detectou redução do TRA e potencial hídrico em plantas de soja não adubadas submetidas à reposição de 40% da capacidade de campo, foram detectados valores de 76% e -1,7MPa,. Estes autores observaram também, que somente em plantas da cultivar Embrapa 48 adubadas com potássio neste mesmo nível de deficiência hídrica, não apresentavam reduções significativas de TRA. O que elucida a importância da adubação potássica no cultivo de plantas submetidas à deficiência hídrica.

6.2 Massa seca e Área foliar

O crescimento é um dos processos mais sensíveis ao déficit hídrico, uma vez que as condições hídricas ótimas dentro da célula são imprescindíveis para que ocorra a turgescência e a divisão celular. A quantificação do acúmulo de biomassa é uma metodologia empregada em estudos para determinar a produtividade das plantas como também para determinar a capacidade das plantas em fixar o carbono para o seu crescimento. Esta ferramenta é bastante utilizada para caracterizar comportamento de tolerância das espécies ao estresse hídrico, uma vez que já está comprovada, que a quantidade de biomassa total das plantas quase sempre é proporcional à disponibilidade de água quando este recurso atua como fator limitante (TERRADAS, 2001).

É possível inferir que no presente trabalho, o tempo de avaliação não foi o suficiente para detectar reduções significativas na biomassa e área foliar de *O. gratissimum*. O trabalho de Costa Filho et. al.(2006) reforça esta hipótese, pois ao estudarem o comportamento de *O. gratissimum* à deficiência hídrica em um período maior (10 semanas) que a do presente trabalho, verificaram redução significativa da produção de biomassa entre tratamentos com 100, 75 e 50% da capacidade de campo, com redução de 62,5% da biomassa seca a em plantas submetidas a 50% da capacidade de campo.

Ekren et al. (2012) estudando espécie do mesmo gênero verificaram que 21 dias (2007) e 12 dias (2008) de tratamento não foram suficientes para detectar

alterações significativas no crescimento em altura de *O. basilicum* acarretadas pelo déficit hídrico, mas observaram que aos 80 dias o crescimento e o rendimento da biomassa seca eram afetados negativamente pelo o estresse hídrico.

De acordo com Pravuschi et al. (2010), plantas de *O. basilicum* cultivadas em canteiros e submetidas a lâminas de irrigação de 0, 50, 75 e 150% da evaporação do tanque, apresentavam seu desenvolvimento prejudicado com irrigação diária excessiva (150%).

Em trabalho realizado por Khalid (2006), a produtividade de *O. basilicum* e de *O. americanum* foi superior em plantas submetidas ao tratamento com 75% da capacidade de campo, sendo que o aumento ou a redução da disponibilidade de água a partir deste tratamento afetava negativamente a produção de biomassa.

Em plantas medicinais o acréscimo de biomassa e crescimento em função da disponibilidade de água também tem sido observado em *Malaleuca aternifolia* (SILVA et al., 2002), *Tanacetum parthenium* (CARVALHO et al., 2003), orégano (MARQUES et al., 2009). *Hyptis pectinata*, (CARVALHO, et al., 2012) e *Melissa officinalis* (MEIRA et al., 2013).

A folha é o órgão vegetal responsável pela captação de energia luminosa necessária para o acúmulo de biomassa, assim, uma grande área de interceptação luminosa favorece o crescimento. Tanto a captação luminosa quanto a transpiração podem ser afetadas por alteração na área foliar, seja por mudanças na produção total, posição e localização das folhas na planta ou até mesmo por abscisão foliar. Quando as plantas estão sob déficit hídrico, uma das primeiras respostas ao estresse é a redução da perda de água; e a redução da área foliar, pode se tornar um excelente mecanismo para a economia de água, porém com privações na captação da energia luminosa e conseqüentemente na produção de biomassa (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A redução da área foliar em função da reposição e suspensão de água pode ser verificada em cultivares de cana-de-açúcar em trabalho de Pincelli e Silva (2012). Com o transcorrer do tempo, algumas cultivares no tratamento com suspensão total de água, foram capazes de aumentar a área foliar e aumentar o número de folhas, mesmo que em menor proporção que as plantas do controle. Dutra et al. (2012) também corroboram os resultados de Pincelli e Silva (2012),

verificando que em plantas de girassol submetidas a diferentes capacidades de retenção de água (60, 80, 100%, alagamento), a área foliar, número e biomassa das folhas eram reduzidas de acordo com a redução da disponibilidade hídrica.

6.3 Trocas gasosas

Os resultados das trocas gasosas mostraram que a deficiência hídrica provocou grandes reduções da assimilação líquida de carbono, condutância estomática, transpiração e grandes acréscimos na concentração interna de CO₂ na espécie *Ocimum gratissimum* submetida a diferentes níveis de reposição de água.

Aos 5 dias, os sensíveis decréscimos do TRA ocorridos dentro dos tratamentos 75 e 50% de reposição de água, somente provocaram reduções na assimilação líquida de carbono. Deste modo, plantas de *O. gratissimum* submetidas a déficit hídrico moderado, pequenas alterações no conteúdo de água das folhas podem levar a reduções na assimilação líquida de carbono, antes mesmo de haver um controle da perda de água pelos estômatos.

Em plantas do tratamento com 0% de reposição de água, todas as variáveis de trocas gasosas acompanharam nitidamente a redução do teor relativo de água. Com base nos reduzidos níveis de concentração interna de CO₂ aos 5 dias de experimento, é possível inferir, que a redução da assimilação líquida de carbono foi dependente da condutância estomática. Deste modo, a redução de cerca de 14% do TRA foi capaz de desencadear uma resposta de controle estomático em *O. gratissimum*, que ocorreu de forma eficiente pois reduziu a perda de água em maior proporção do que restringiu a entrada de CO₂, afetando moderadamente as taxas de assimilação líquida de carbono aos 5 dias.

Em condições estresse hídrico a capacidade das plantas em impedir a perda de água sem afetar de forma muito severa a difusão de CO₂ para o mesófilo, representa uma estratégia de tolerância a seca que permite com que esta mantenha por um período mais prolongado sua hidratação e as suas taxas fotossintéticas. Por isto, a busca de plantas tolerantes a seca deve levar em consideração altas taxas fotossintéticas acompanhada de condutância estomática e transpiração baixa (OSMOND et al.,1980).

Aos 9 dias com um maior tempo de imposição do déficit hídrico, a assimilação líquida de carbono, condutância estomática e transpiração chegaram a ficar quase nulas em plantas que não receberam reposição de água, contrastando com os altos níveis de concentração interna de CO₂, encontrados. Isto sugere que a baixa condutância estomática acompanhada de acréscimo da concentração interna de CO₂ e decréscimo da assimilação líquida de carbono é indício da baixa eficiência do processo de carboxilação da espécie estudada quando submetida a condições severas de deficiência hídrica. A redução da assimilação líquida de carbono possivelmente foi dependente de limitações bioquímicas, como por exemplo, alteração da síntese e da atividade de enzimas envolvidas no processo de fixação de carbono. Em estresse severo a redução da fotossíntese está relacionada com a perda da atividade da rubisco (inibição ou não ativação) e pela diminuição da regeneração da ribulose 1,5- bifosfato devido ao baixo suprimento de ATP e NADPH para o ciclo de redução do carbono (TEZARA et al., 1999, LAWLOR, 2002). Em função do *O. gratissimum* tratar-se de uma espécie com metabolismo C₃, possivelmente parte deste CO₂ pode ter sido oriundo do processo de fotorrespiração, desencadeado para a proteção da maquinaria fotossintética contra processos deletérios como a fotoinibição, ao servir como forma utilização da energia excedente (NIYOGI, 2000).

A baixa eficiência de carboxilação foi sugerida por Pacheco et al. (2011) como a principal responsável pela redução da taxa fotossintética de *Calendula officinalis* submetida a total suspensão de irrigação e a 100 µM de ABA por nove dias.

Ghuannoun et al. (2003) investigando o efeito de fatores estomáticos e não estomáticos de inibição da fotossíntese em plantas C₄ também observou que a redução na assimilação de carbono era dependente de limitações bioquímicas. Estes autores perceberam que a compensação da concentração de CO₂ de *Panicum coloratum* e *Chenchrus ciliaries* aumentou acentuadamente quando o TRA estava abaixo de 70%. Resultados semelhantes foram observados em *O. gratissimum*, entretanto, somente foi possível observar acréscimos na concentração de CO₂ quando as plantas estavam com o TRA abaixo de 55%.

De forma diferente ao observado por Ghuannoun et. al. (2003) e Pacheco et al. (2011), a redução das taxas fotossintéticas podem ocorrer quase que

exclusivamente por redução da condutância estomática. De acordo com Sausen e Rosa (2010) em plantas de mamona submetidas a 53 dias de suspensão de irrigação, a limitação imposta pelo fechamento estomático foi a principal responsável pela redução da fotossíntese nesta espécie.

Em estresse por seca moderada, o fechamento estomático é a primeira medida responsável pela limitação da fotossíntese, no entanto em seca severa, a redução no conteúdo de rubisco acarretada pela regulação negativa ou inibição dos processos metabólicos, é a limitação dominante da assimilação de CO₂ e inibição da fotossíntese (FLEXAS; MEDRANO, 2002).

Apesar de na literatura plantas sob deficiência hídrica terem as taxas fotossintéticas afetadas por limitações estomáticas e não estomáticas, é possível observar em algumas espécies, que a imposição do déficit hídrico pode não afetar o processo fotossintético. O estudo do efeito da disponibilidade hídrica realizado por Marques et al. (2009) corrobora esta idéia, ao verificar que as lâminas de irrigação 0, 50, 75 e 100% , não afetaram as trocas gasosas da espécie *Origanum vulgare* (orégano) cultivada em canteiros por 90 dias. Estes autores concluíram também que esta espécie apresentava a capacidade de manter seus mecanismos fisiológicos mesmo sob condições de déficit hídrico.

6.4 Pigmentos cloroplastídicos

Durante a deficiência hídrica a estabilidade da clorofila pode ser um critério promissor para seleção de espécies tolerantes a seca (ARUNYANARK et al., 2008). Percebe-se que em relação aos 0 e 5 dias de avaliação a produção de pigmentos de *O. gratissimum* não sofreu alterações acarretadas pela deficiência hídrica, podendo ser observada a manutenção da capacidade de produção de clorofilas e carotenóides. Nesse período o acréscimo de pigmentos não acompanhou o decréscimo da assimilação de carbono, reforçando a idéia que a redução da fotossíntese aos 5 dias não foi acarretada por danos na cadeia de transporte de elétrons.

Entre os 5 e 9 dias de avaliação, as reduções do conteúdo de clorofilas e carotenóides nos tratamentos de déficit hídrico foi acarretada pela degradação de pigmentos. Porém ao observar o conteúdo de pigmentos cloroplastídicos entre os 0 e 9 dias de avaliação dentro dos tratamentos 50 e 75% de reposição de água,

percebe-se que o teor de clorofilas e carotenóides foram mantidos à níveis semelhantes ou superior à avaliação inicial.

Dutra et al. (2012) também detectaram em girassol, submetido a diferentes disponibilidades de água, que com aumento do tempo de imposição dos regimes hídricos o conteúdo de clorofilas apresentava aumento seguido de redução nas últimas avaliações. Porém de forma diferente, a redução dos pigmentos não foi acarretada pela redução da disponibilidade de água e sim pelo aumento. Devido ao tratamento de 60% de retenção de água e alagamento terem apresentado maior e menor conteúdo de clorofilas respectivamente, os autores sugeriram que os elevados níveis de água nos tratamentos alagamento, 100 e 80% de retenção de água possivelmente começaram a provocar o aumento de ABA e etileno induzindo a degradação de clorofilas.

Em plantas de *O. gratissimum* que não receberam reposição de água, entre 0 e 9 dias de avaliação, houve redução do teor de carotenóides. A redução de pigmentos cloroplastídicos em estresse severo tem sido sugerida como consequência da fotoinibição e fotodestruição sob situação de estresse hídrico severo (LOGGINI et al. 1999). Em condições de deficiência hídrica, as alterações ocorridas no conteúdo de clorofilas e carotenóides podem afetar a fotossíntese, pois estes pigmentos são responsáveis pela captação e transmissão da energia luminosa que é utilizada para o processo de fixação de carbono (TAIZ; ZEIGER, 2013). Sendo assim, as baixas concentrações de carotenóides reforçam a idéia que em plantas submetidas ao déficit hídrico mais severo, a taxa fotossintética aos 9 dias, não foi dependente da condutância estomática e sim por limitações na fixação de carbono devido a danificações do aparato fotossintético.

De acordo com Abdullatif e Asiri (2012) avaliando efeito da disponibilidade de água em espécie do mesmo gênero observaram que os conteúdos de clorofilas e carotenóides não eram afetados pela reposição de 50, 30 e 10% da capacidade de campo, mas sim pela fase de crescimento. O estágio de florescimento promovia o aumento, enquanto a fase de produção de sementes promovia a redução destes pigmentos em *Ocimum basilicum*.

Silva et al. (2013) estudando o efeito da suspensão de água em cultivares de cana-de-açúcar por 15 dias, verificou que a depender das cultivares avaliadas

a deficiência hídrica era capaz de provocar a redução, ou não provocar alterações significativas nas concentrações de clorofilas e carotenóides.

6.5 Solutos orgânicos

O acúmulo de solutos orgânicos tem a capacidade de promover ajuste osmótico e manter por mais tempo a hidratação dos tecidos, sem depreciar as atividades enzimáticas em plantas estressadas (LARCHER, 1986). Devido isto, a quantificação de solutos osmóticos associada à caracterização do status hídrico da planta tem sido bastante utilizada para caracterizar o grau tolerância de espécies, cultivares e genótipos ao estresse hídrico e salino. Os solutos orgânicos em *O. gratissimum* foram altamente acumulados com a deficiência hídrica. Sendo possível observar que em TRA abaixo de 79%, já ocorria o aumento de carboidratos, aminoácidos e proteínas. No entanto, somente foi possível perceber acréscimos dos teores de prolina em TRA menores, abaixo de 55%. No tratamento 0% de reposição de água o acúmulo de solutos orgânicos ocorreu em maior magnitude e acompanhado de potenciais hídricos expressivamente baixos (-3,7 MPa). Isso demonstra que o acúmulo de carboidratos, aminoácidos e prolina promovem o ajustamento osmótico na espécie *O. gratissimum* quando submetida à déficit hídrico.

A deficiência hídrica pode levar a uma depreciação da eficiência da fotossíntese reduzindo o fornecimento de açúcares solúveis para os tecidos, mas como forma de manter os processos celulares, fontes de reservas de amido podem ser quebradas e convertidas em açúcares solúveis para as necessidades energéticas das plantas e para promoção do ajuste osmótico (ROSA et al., 2009). Desta forma, apesar da espécie *O. gratissimum* apresentar grandes decréscimos da assimilação de carbono houve um aumento significativo no conteúdo de carboidratos solúveis, que possivelmente foi acarretado pela quebra de fontes de reserva de carbono.

O déficit hídrico severo provoca a redução do teor de proteínas devido a redução da síntese ou pelo processo de desnaturação das mesmas, seja pela ação de espécies reativas de oxigênio, temperatura e alteração do pH. A degradação de proteínas tem sido reportada como causa do aumento de aminoácidos em plantas estressadas. Lechinoski et al. (2007) estudando a

influência do estresse hídrico nos teores de proteínas e aminoácidos perceberam que houve uma diminuição drástica de proteínas e aumento de aminoácidos, justificando que o comportamento inversamente proporcional destes metabólitos, está relacionado com a sensibilidade à falta de água no solo de *Tectona grandis*.

De forma diferente, o acúmulo de aminoácidos em *O. gratissimum* não foi consequente da degradação de proteínas, o que sugere que a "síntese de novo" promoveu o acúmulo de aminoácidos nesta espécie. O acúmulo de proteínas pode estar relacionado em parte, pelo o aumento da expressão gênica de enzimas envolvidas no mecanismo de tolerância ao estresse (AGARWAL; SHAHEEN, 2007, NEPOMUCENO et al., 2001). Destacando-se as enzimas envolvidas nas vias de produção de prolina, aminoácidos e carboidratos.

O acúmulo de prolina pode ter exercido um importante papel na manutenção da integridade de proteínas dentro da célula, por ter capacidade de promover a estabilização de estruturas sub-celulares, regulação do pH celular e sequestro de radicais livres (SCHOBERT; TSCHESCHE, 1978, HARE; CRESS, 1997, VERBRUGGEN; HERMANS, 2008, SZABADOS; SAVOURE, 2009, NEPOMUCENO et al., 2001).

No entanto, o estudo do efeito estresse hídrico em espécies do gênero *Ocimum*, a mesma relação entre proteínas e prolina não foi detectada. Sendo observado maior acúmulo de prolina e menor conteúdo de proteínas quando as espécies *O. basilicum* e *O. americanum* eram submetidas aos tratamentos com 50 % da capacidade do solo (KHALID, 2006).

O acúmulo de prolina em condições de deficiência hídrica também é observado em *Ocimum basilicum* em estudo de Abdullatif e Asiri (2012). Estes autores verificaram que quando plantas de *O. basilicum* eram submetidas a déficit hídrico na fase de florescimento, ocorria acúmulo de prolina, no entanto, na fase de produção de semente o comportamento era inverso.

Carvalho (2005) estudando respostas de plantas de *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahyba* à deficiência hídrica relatou, que o aumento nos teores de aminoácidos solúveis totais, prolina e açúcares solúveis totais provocou a redução do potencial osmótico nas duas espécies.

6.6 Teor de óleo essencial

A produção de óleo essencial foi depreciada com a deficiência hídrica, demonstrando a importância da água na produção dos metabolitos secundários em *O. gratissimum*. Provavelmente uma maior disponibilidade de água por não afetar o processo de assimilação de carbono, permite que sejam disponibilizados esqueletos de carbono em maior proporção para a produção dos metabolitos secundários. Em condições de deficiência hídrica com a redução da assimilação líquida de carbono, a redução da dos constituintes do óleo essencial poderia ter ocorrido para disponibilizar maior proporção de esqueletos de carbono para produção de metabolitos envolvidos na manutenção dos processos celulares durante o estresse hídrico.

De acordo com Graham e Graham (1996) a regulação negativa dos passos iniciais da biossíntese de fenilpropanoides era acarretada pelo ABA, o que suporta a idéia que este fitorregulador poderia estar envolvido na redução do conteúdo de óleo essencial em *O. gratissimum* durante o estresse hídrico.

A mesma relação ocorreu em trabalho de Abdullatif e Asiri (2012), que observaram o aumento da produção de óleo essencial de *O. basilicum* no tratamento de maior reposição de água (controle), tanto no estágio de florescimento quanto na fase de produção de sementes. No entanto, resultados diferentes foram observados para a mesma espécie submetida a condições de campo. Ekren et al. (2012) verificaram que a proporção de óleo essencial aumentava à medida que a quantidade de água de irrigação aplicada diminuía.

Em trabalho de Khalid (2006) foi mostrado que tanto o excesso de água quanto o maior nível de déficit hídrico (50% da capacidade de campo) provocava o aumento da produção e dos constituintes principais do óleo essencial das espécies *O. basilicum* e *O. americanum*.

Silva et al. (2002) verificaram que regime hídrico de menor disponibilidade de água afetava o teor de óleo essencial devido à menor produção de biomassa, no entanto não influenciava a composição do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

7. CONCLUSÕES

A espécie *O. gratissimum* mostrou-se sensível à deficiência hídrica através da grande redução do conteúdo de água das folhas, assimilação de carbono e degradação de pigmentos, no entanto, desenvolveu alguns mecanismos de tolerância ao estresse hídrico de curto prazo como redução da transpiração, acúmulo de solutos orgânicos e grande redução do potencial hídrico sem afetar significativamente a massa seca.

A maior disponibilidade de água é essencial para a obtenção de maior produção de óleo essencial em *O. gratissimum*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLATIF, B. M.; ASIRI, N. A. Effect of deficit irrigation on photosynthesis pigments, proline accumulation and oil quantity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) at flowering and seed setting stages. **International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences**, v.1, n.3, p. 271-284, Apr, 2012.
- AGARWAL, S.; SHAHEEN, R.. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, n.2, p.149-161, 2007.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.
- ARUNYANARK, A. et al. Chlorophyll Stability is an Indicator of Drought Tolerance in Peanut. **J. Agronomy & Crop Science**, v.194, p.113-125, 2008.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v.39, p.205-207, 1973.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- CARVALHO, L. M. et al. Disponibilidade de água no solo e crescimento de artemísia. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 726-730, out.-dez., 2003.
- CARVALHO, C. J. R.. Respostas de plantas de *Schizolobium amazonicum* [*S. parahyba* var. *amazonicum*] e *Schizolobium parahyba* [*Schizolobium parahybum*] à deficiência hídrica. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p.907-914, 2005.

- CARVALHO, J. S. B.; MARTINS, J. D. L.; MOREIRA, K. A. Respostas fisiológicas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. ao estresse hídrico. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.12, n. 2, 2012.
- CASCARDO, J. C. M.; OLIVEIRA, L. E. M.; ALVES, J. D. Açúcares e compostos nitrogenados orgânicos na seringueira cultivada em solo com diferentes doses de gesso agrícola sob dois regimes hídricos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n.1, p.35-40, 1990.
- CATUCHI, T. A., et al. Respostas fisiológicas de cultivares de soja à adubação potássica sob diferentes regimes hídricos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, n.4, p.519-527, abr., 2012.
- COSTA FILHO, L. O.; ENCARNAÇÃO, C. R. F.; OLIVEIRA, A. F. M. Influência hídrica e térmica no crescimento e desenvolvimento de *Ocimum gratissimum* L. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.8, n.2, p.8-13, 2006.
- DONOSO, S., et al. Respuesta fisiológica y de crecimiento en plantas de *Quillaja saponaria* y *Cryptocarya alba* sometidas a restricción hídrica. **Bosque**, v.32, n.2, p.187-195, 2011.
- DUBOIS, M., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- DUTRA, C. C. et al. Desenvolvimento de plantas de girassol sob diferentes condições de fornecimento de água. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 2657-2668, 2012.
- EKREN, S., et al. The effect of different irrigation water levels on yield and quality characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum* L.). **Agricultural Water Management**, v. 109, p.155-161, 2012.
- FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of Photosynthesis in C3 Plants: Stomatal and Non-stomatal Limitations Revisited. **Annals of Botany**. v. 89, p. 183-189, 2002.
- GHANNOUM, O., et al. Nonstomatal limitations are responsible for droughtinduced photosynthetic inhibition in four C4 grasses. **New Phytologist**, v.159, p.599-608, 2003.
- GRAHAM, T. L.; GRAHAM, M. Y. Signaling in Soybean Phenylpropanoid Responses: Dissection of Primary, Secondary, and Conditioning Effects of Light, Wounding, and Elicitor Treatments. **Plant Physiol.** v.110, p.1123-1133, 1996.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A.. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p.79-102, 1997.

- KHALID, KH. A. Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). **International Agrophysics**, v. 20, p.289-296, 2006.
- LARCHER, Walter. **Ecofisiologia vegetal**. Sao Paulo: EPU, 1986. 319p.
- LAWLOR, D. W. Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the Role of ATP. **Annals of Botany**, v. 89, p. 871-885, 2002.
- LECHINOSKI, A. et al.. Influência do Estresse Hídrico nos Teores de Proteínas e Aminoácidos Solúveis Totais em Folhas de Teca (*Tectona grandis* L. f.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n.2, p. 927-929, jul., 2007.
- LEMONS, J. A., et al. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 55-58, feb., 2005.
- LOGGINI, B., et al. Antioxidative Defense System, Pigment Composition, and Photosynthetic Efficiency in Two Wheat Cultivars Subjected to Drought. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1091-1099, mar., 1999.
- MARCHESE, J. A. et al. Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*Artemisia annua* L., Asteraceae). **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.22, n.1, n.1-9, 2010.
- MARQUES, P. A. A.; BERNADI FILHO, L.; SANTOS, A. C.P.. Crescimento, produção de óleo essencial e trocas gasosas em orégano influenciados por diferentes lâminas de irrigação. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1888-1892, set, 2009.
- MEIRA, M. R., et al. Crescimento vegetativo, produção de fitomassa e de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob diferentes lâminas de irrigação. **Ciência Rural**, v.43, n.5, p.779-785, mai., 2013.
- NAKAMURA, C. V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94., n.5, p.675-678, 1999.
- NEPOMUCENO, A. L., et al. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.23, p.12-18, nov.- dez., 2001.
- NIYOGI, K. K.. Safety valves for photosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.455-460, 2000.
- OLIVEIRA, L. M., et al. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n.1, p.73-78, 2011.

- OSMOND, C. B., BJORKMAN, O.; ANDERSON, J. Water movement and plant response to water stress. In: Ecological studies. Physiological process in plant ecology, towards a synthesis with *Atriplex*. **Springer Verlag**, v. 36, p. 251-290, 1980.
- PACHECO, A. C.; CAMARGO, P. R.; SOUZA, C. G. M. Deficiência hídrica e aplicação de ABA nas trocas gasosas e no acúmulo de flavanoides em calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.33, n.2, p.275-281, 2011.
- PEDROL, N.; RAMOS, P.; REIGOSA, M. J. Phenotypic plasticity and acclimation to water deficits in velvet-grass: a long-term greenhouse experiment. Changes in leaf morphology, photosynthesis and stress-induced metabolites. **Journal Plant Physiology**, v. 157, p.383-393, 2000.
- PINCELLI, R. P.; SILVA, M. A.. Alterações morfológicas foliares em cultivares de cana-de-açúcar em resposta à deficiência hídrica. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p. 546-556, jul.-ago., 2012.
- PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.3, p.869-882, 2011.
- PRAVUSCHI, P. R. et al. Efeito de diferentes lâminas de irrigação na produção de óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.4, p.687-693, 2010.
- ROSA, M., et al. Soluble sugars - Metabolism, sensing and abiotic stress. A complex network in the life of plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.4, n.5, 2009.
- SANTOS, D, et al.. Cultivares de trigo submetidas a déficit hídrico no início do florescimento, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.8, p.836-842, 2012.
- SAUSEN, T. L.; ROSA, L. M. G. Growth and carbon assimilation limitations in *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) under soil water stress conditions. **Acta Botanica Brasília**, v.24, n.3, p. 648-654, 2010.
- SCHOBERT, B.; TSCHESCHE, H.. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 541, p.270-277, 1978.
- SCHOLANDER, P. F. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v.14, p.339-346, 1965.
- SELMAR, D.; KLEINWACHTER, M. Stress Enhances the Synthesis of Secondary Plant Products: The Impact of Stress-Related Over-Reduction on the

- Accumulation of Natural Products. **Plant Cell. Physiology**. v.54, n.6, p.817-826, 2013.
- SILVA, R. S. et al. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.
- SILVA, M. A. et al. Respostas fisiológicas de cultivares de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica e a reidratação. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p. 28-35, jul.-set., 2013.
- SOARES, A. M. S., MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 9-19, 2007.
- SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v.15, n.2, p. 89-97, 2009.
- TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.
- TERRADAS, Jaume. **Ecologia de la vegetacion**: de la ecofisiologia de las plantas a la dinamica de comun idades y paisajes.Barcelona: Ediciones Omega, 2001. 703 p.
- TEZARA, W. et al.. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. **Nature**, v. 401, p. 914-917, 1999.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, p. 753-759, 2008.
- WEATHERLEY, P. E. Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. **New Phytologist**, v.49, p.81-87, 1950.
- WELLBURN, A. R.. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal Plant Physiology**, v.144, p.307-313, 1994.
- YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of aminoacid with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

9. CONCLUSÕES GERAIS

As espécies *Hyptis fruticosa* e *Ocimum gratissimum* se comportam de forma distinta na preservação do conteúdo de água dos tecidos durante a deficiência hídrica. A espécie *Hyptis fruticosa* mantém o conteúdo de água mostrando-se mais tolerante que a espécie *O. gratissimum* que apresenta grandes perdas de água nos tecidos.

Ambas as espécies apresentaram manutenção da matéria seca, aumento de solutos orgânicos e redução do potencial hídrico que são mecanismos de tolerância a deficiência hídrica.

