



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

DANIEL DA SILVA DE JESUS

**ESTRESSE DE METAIS NA PRODUTIVIDADE DE
COMPOSTOS ORIUNDOS DO METABOLISMO
SECUNDÁRIO DE *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex
Benth.) J.F.B. Pastore**

Feira de Santana - BA
2016

DANIEL DA SILVA DE JESUS

**ESTRESSE DE METAIS NA PRODUTIVIDADE DE
COMPOSTOS ORIUNDOS DO METABOLISMO
SECUNDÁRIO DE *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex
Benth.) J.F.B. Pastore**

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

Orientador: Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira
Co-orientador: Dra. Angélica Maria Lucchese
Co-orientador: Dr. André Dias de Azevedo Neto

Feira de Santana - BA
2016

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

J56e Jesus, Daniel da Silva de
Estresse de metais na produtividade de compostos oriundos do metabolismo secundário de *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B. Pastore / Daniel da Silva de Jesus. – Feira de Santana, 2016.

110 f. : il.

Orientador: Lenaldo Muniz de Oliveira.
Coorientadora: Angélica Maria Lucchese.
Coorientador: André Dias de Azevedo Neto.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2016.

1. *Martianthus leucocephalus* – Metais traços. 2. Plantas medicinais. I. Oliveira, Lenaldo Muniz de, orient. II. Lucchese, Angélica Maria, coorient. III. Azevedo Neto, André Dias de, coorient. IV Universidade Estadual de Feira de Santana. V. Título.

CDU: 582.949.2

*Aos meus familiares por fornecerem o amor e o companheirismo dos quais sempre
necessitei*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, desde que sempre agradeço a ele por tudo em minha vida.

À toda minha família, em especial, Dona Letícia e Seu Gonzaga pela orientação e incentivo aos estudos, aos meus irmãos pelo apoio irrestrito e aos meus sobrinhos, grandes fontes de distração e carinho.

À Tay, minha esposa, tão amorosa e paciente durante todo este período.

À Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV) pela excelente oportunidade concedida.

À FAPESB e CAPES pelo apoio financeiro concedido

Ao meu orientador, Dr Lenaldo Muniz de Oliveira, por ter tido paciência e transmitir um pouco de sua experiência e conhecimento.

Aos Co-Orientadores, Dra Angélica Maria Lucchese e Dr André Dias de Azevedo Neto, os quais tiveram participação comparável a do Dr Lenaldo Muniz de Oliveira.

À MSc Ingrid Gutierrez Mancio, Dra Edna Dória Peralta e Dra Serly Santiago Machado que tiveram uma participação crucial na parte técnica deste trabalho.

À Bianca Azevedo, Luma Passos, Flávia de Souza, Maria Valois e aos demais amigos discentes do PPGRGV, os quais prefiro não citar individualmente para não correr o risco de ser injusto.

Ao corpo de professores do PPGRGV, pela atenção e apoio e;

Ao corpo técnico e estagiários do LAPRON e da unidade experimental horto florestal da UEFS.

RESUMO

Espécies da família Lamiaceae têm sido amplamente estudadas, devido as suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antivirais. Existe interesse científico no desenvolvimento de tecnologias para a potencialização de sistemas de produção das plantas medicinais, tendo em vista que a baixa concentração dos compostos bioativos representa um dos maiores obstáculos para a sua exploração econômica. Trabalhos com algumas espécies têm demonstrado que os metais traços, como o Cd, Cu e Zn, atuam como eliciadores abióticos, influenciando de forma direta na produção de substâncias bioativas. *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore é uma espécie que produz óleo essencial rico em formiato de isobornila, com elevada atividade antimicrobiana. Neste trabalho objetivou-se avaliar o efeito do estresse por Cd, Cu e Zn, sobre a espécie, quantificando-se o crescimento, acúmulo de minerais nas diversas partes da planta, teor de óleo essencial e de seus componentes majoritários, teor de compostos fenólicos e de enzimas antioxidantes. Além disso, foi verificado o potencial fitorremediador desta espécie, na presença dos metais testados. Quando aplicados em elevadas concentrações todos os metais provocaram forte redução no crescimento de *M. leucocephalus*, entretanto, nestas condições apenas o Zn provocou incremento no teor dos compostos voláteis. A exposição das plantas desta espécie a concentrações mais amenas dos metais provocou menor redução no crescimento e desbalanço nutricional de *M. leucocephalus*. Neste caso, apenas o Cd estimulou maior produção de compostos voláteis, mas nenhum tratamento com metal alterou a qualidade dos óleos essenciais obtidos. As plantas acumularam Cd, Cu e Zn em maior concentração nas raízes, demonstrando o potencial da espécie para a fitoestabilização desses metais em ambientes contaminados. O estresse por Cd provocou aumento da concentração de fenólicos totais, enquanto que a atividade das peroxidases e a peroxidação lipídica foi maior nas plantas submetidas aos três metais.

Palavras-chave: metais traços, fitoquímica, eliciadores, Lamiaceae

ABSTRACT

Lamiaceae species have been widely studied due to their antioxidant, antimicrobial and antiviral properties. There is scientific interest in developing technologies for the enhancement of production systems of medicinal plants, given that the low concentration of bioactive compounds is a major obstacle to their economic exploitation. Works with some species have shown that traces metals such as Cd, Cu and Zn, act as abiotic elicitors, directly influencing in the production of bioactive substances. *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B. Pastore produces rich essential oil in isobornyl formate with high antimicrobial activity. This work aimed to evaluate the effect of Cd, Cu and Zn stress, on the species through growth, minerals accumulation, essential oil content and its major components, phenolic content and antioxidant enzymes. Furthermore, the phytoremediation potential of this species was observed in the presence of the tested metals. When applied in high concentrations all metals caused sharp reduction in the *M. leucocephalus* growth, however, was observed that Zn stress caused an increase in the content of volatile compounds. Plant exposure of to milder metals concentrations caused less growth reduction and nutritional unbalance *M. leucocephalus*. In this case, Cd stress stimulate higher production of volatile compounds. No metal treatment alters the essential oils quality. Cd, Cu and Zn was accumulated in higher concentration in the roots, demonstrating the potential of this species to phytostabilization in contaminated environments. The Cd stress caused an increase in total phenolics concentration, while the peroxidases activity and lipid peroxidation was higher in metals stressed plants.

Keywords: traces metals, phitochemitry, elicitors, Lamiaceae

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 1. Alguns produtos farmacêuticos elaborados a partir de substâncias sintetizadas por plantas medicinais 06

Figura 2. Vias de síntese do isopentenil pirofosfato (IPP), molécula precursora dos terpenos. A via do ácido mevalônico ocorre no citoplasma (A), enquanto a via da desoxirilulose fosfato ocorre nos plastos (B). HGM-CoA sintase: 3 hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase 09

Figura 3. Via do chiquimato para a síntese dos fenilpropanoides nas plantas. **EPSP sintase:** 5-enolpiruvilchiquimato-3-phosphate sintase 10

Figura 4. Influência dos metais nas vias de sinalização para a ativação de genes associados à síntese de compostos secundários conforme Nasim e Dhir (2010). Linhas tracejadas sugerem que a ativação gênica por meio do etileno e ácido 12-oxo-fitodioneico (OPDA) ocorre de forma indireta 18

Figura 5. Modelo proposto por Selmar e Kleinwächter (2013) como possível explicação para o incremento de compostos naturais em plantas submetidas a estresses ambientais. Nas plantas submetidas às condições de estresse, a maior resistência estomática favorece a síntese dos compostos naturais 19

Tabela 1. Concentrações de Cd, Cu e Zn verificadas na solução do solo e nas folhas de plantas de diversas espécies de acordo com Kabata-Pendias, 2011..... 14

CAPÍTULO 1

Figura 1. (A) *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivada hidroponia; (B) comparação do crescimento de plantas estressadas e em condições controle (C e D) Clevenger e óleo após 3 horas de destilação; (E) Placas digestoras (F) ICP-OES 33

Figura 2. Massa seca de folhas (MSF), caules (MSC), raízes (MSR) e total (MST) de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivadas sob diferentes níveis de Cd, Cu, e Zn..... 34

Figura 3. Concentração de metais nas folhas, caules e raízes de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivadas sob diferentes níveis de Cd, Cu, e Zn..... 36

Figura 4. Taxa de crescimento relativo (TCR), suculência (Suc) e rendimento de compostos voláteis de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivadas sob diferentes níveis de Cd, Cu, e Zn 37

CAPÍTULO 2

Figura 1. (A) *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivada hidroponia; (B) comparação do crescimento de plantas estressadas e em condições controle (C e D) Clevenger e óleo após 3 horas de destilação; (E) Placas digestoras (F) ICP-OES..... 53

Figura 2. Massa seca da parte aérea (MSPA), raízes (MSR), total (MST) e teor de óleo essencial de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetidas a estresse por Cd ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cu (15 mmol L^{-1}) e Zn (75 mmol L^{-1})... 55

Figura 3. Concentrações de enxofre (S), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K) e cálcio (Ca) na parte aérea e raízes de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetidas a estresse por Cd ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cu (15 mmol L^{-1}) e Zn (75 mmol L^{-1})..... 57

Figura 4. Concentrações de cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn) e de cádmio (Cd) na parte aérea e raízes de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetidas a estresse por Cd ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cu (15 mmol L^{-1}) e Zn (75 mmol L^{-1})..... 59

Tabela 1. Principais constituintes químicos do óleo essencial de *Marthianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle (C) e submetidas a estresse por Cd ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cu (15 mmol L^{-1}) e Zn (75 mmol L^{-1}) em sistema hidropônico..... 56

Tabela 2. Fator de bioacumulação nas folhas (FB) e nas raízes (FB') e fator de translocação (FT) de cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) de plantas *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetidas a estresse por Cd ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cu (15 mmol L^{-1}) e Zn (75 mmol L^{-1})..... 60

CAPÍTULO 3

Figura 1. (A e B) *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivada hidroponia; (C) sonicação; (D e E) amostras de fenolicos e de flavonoides prontas para a análise em espectrofômetro; (F) espectrofotômetro modelo UV-1800 UV-VIS; (G) cubetas contendo amostras para a leitura de fenolicos..... 76

Figura 2. Concentração de malondialdeído (MDA) e atividade das peroxidases do ascorbato (APX) e do guaiacol (GPX) de plantas de *Marthiantus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore nas condições controle (C) e submetidas a estresse por Cd ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cu (15 mmol L^{-1}) e Zn (75 mmol L^{-1})..... 79

Figura 3. Concentração de fenólicos e de flavonóides totais em plantas de *Marthiantus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore nas condições controle (C) e submetidas a estresse por Cd ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cu (15 mmol L^{-1}) e Zn (75 mmol L^{-1})..... 80

SUMÁRIO

Introdução geral	1
Referencial teórico	5
Plantas medicinais como fonte de renda para o semiárido	5
Principais classes de substâncias bioativas sintetizadas por plantas medicinais e aromáticas	8
Importância medicinal da família Lamiaceae e de <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore	11
Potencialização da produtividade de metabólitos secundários	15
Referências	20
CAPÍTULO 1	27
Crescimento e teor de compostos voláteis de <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetida ao estresse por metais	27
Introdução	29
Material e métodos	30
Resultados	33
Discussão	38
Conclusão	41
Referências	41
CAPÍTULO 2	46
Bioacumulação de Cd, Cu e Zn, nutrientes minerais e produção compostos voláteis em <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. Ex benth.) J.F.B. pastore submetida a estresse com metais traços	46
Introdução	48
Material e métodos	50
Resultados	54
Discussão	60
Referências	64
CAPÍTULO 3	70
Estresse oxidativo e produção de fenólicos e de flavonóides totais em plantas de <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetidas ao estresse por metais	70
Introdução	72
Material e Métodos	74
Resultados	77

Discussão	80
Referências	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
APÊNDICES	89

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas medicinais são utilizadas por comunidades tradicionais em todo o mundo como principal meio terapêutico conhecido para o tratamento de muitos males. Em muitos países em desenvolvimento, uma grande proporção da população depende exclusivamente das plantas medicinais, para sanar problemas de saúde (OMS, 2010). Algumas comunidades, mesmo quando contempladas com a medicina moderna, mantêm o uso das plantas por razões históricas e culturais. Adicionalmente, o comércio local de materiais vegetais representa grande importância para economia local (Mafimisebi et al., 2013).

Ao nível mundial o mercado de produtos químicos derivados de plantas, que inclui fragrâncias, fármacos e ingredientes aromatizantes, também é valioso e ultrapassa vários bilhões de dólares por ano (Uprety et al., 2012). De maneira semelhante, no Brasil, o comércio destas espécies está em expansão devido ao surgimento de novos segmentos de mercado, como o dos fitoterápicos bem como da incorporação de plantas medicinais e seus produtos no Sistema Único de Saúde (SUS). Uma variedade de produtos, tais como comprimidos, cápsulas, chás e óleos surgem frequentemente a partir do processamento de plantas aromáticas e medicinais (Souza et al., 2012).

Não somente considerando este aspecto, o estudo de plantas tradicionais e seus produtos na região Nordeste do Brasil deve ser salientado. As regiões semiáridas brasileiras apresentam sérias restrições sócio-ambientais, havendo alto grau de degradação ambiental, e, apesar da promoção da conservação da biodiversidade da Caatinga não ser uma ação simples, a sustentabilidade pode ser fundamental para a adoção de modos de uso racionais dos recursos naturais (MMA, 2002). A agregação de valor para as plantas medicinais pode direcionar o uso mais racional (menos extrativista) desses recursos naturais.

Considerando estes aspectos, a domesticação das plantas medicinais e aromáticas pode ser considerada um tema crucial, desde que possibilita uniformidade de cultivo, qualidade e produtividade de metabolitos secundários. A maximização da produção destas substâncias é desejável e ao mesmo tempo necessária. Programas de cultivo comercial destas espécies devem contemplar um conhecimento elevado sobre o crescimento e o desenvolvimento, bem como sobre os processos fisiológicos associados à biossíntese dos compostos ativos (MMA, 2002).

A família Lamiaceae é um destacado grupo de plantas medicinais e contempla diversas espécies que ocorrem nas regiões semiáridas brasileiras. Assim, esta família é de grande interesse para a pesquisa científica. Seus principais produtos naturais são os óleos essenciais, complexo de substâncias que apresenta comprovado potencial como antioxidante, antibacteriano e antiviral substâncias (Hassanzadeh et al., 2011). Como outros representantes deste grupo, *M. leucocephalus* demonstra elevado potencial farmacêutico e econômico, mas tem sido pouco contemplada com estudos que viabilizem sua exploração econômica de forma sustentável.

Um dos maiores obstáculos para a exploração dos metabólitos secundários é a sua baixa concentração nos tecidos vegetais, desde que este caráter limita a possibilidade de cultivo. Consequentemente, existe um interesse no reconhecimento de agentes que estimulem a síntese de destes compostos nas plantas. Estresses ambientais abióticos como temperatura extrema, seca, salinidade, tem sido investigadas para aumentar a produção ou para induzir a síntese de novo de metabólitos secundários vegetais (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). O estresse provocado por metais também tem sido investigado e demonstra resultados promissores, sendo verificada uma capacidade de desencadear alterações fisiológicas diversas as quais incluem maior produção dos compostos bioativos (Nasim e Dhir, 2010). Apesar, das explicações exatas sobre potencial eliciador dos metais carecerem de maiores detalhes, a análise deste efeito nas diversas espécies tem sido estimulada.

Outro aspecto que deve ser discutido no contexto das plantas expostas a ambientes contaminados por metais, é o seu potencial em extrair estes elementos do ambiente. De fato algumas espécies vegetais apresentam elevada capacidade de extrair e concentrar grandes quantidades de metais nos tecidos. Com o auxílio destes organismos os elementos podem ser removidos de locais poluídos, sendo o mecanismo denominado fitorremediação (Hameed et al., 2012). Tal processo tem sido bastante investigado por ser considerado eficiente e de baixo custo quando comparado aos meios usuais de remediação (Vamerali et al., 2010). Neste sentido, muitos representantes da família Lamiaceae figuram entre as plantas potencialmente reconhecidas como fitorremediadoras (Prasad e Freitas, 2003; Zheljzakov et al., 2008; Seyedsadr et al., 2013).

Assim, considerando que *M. leucocephalus* é uma espécie aromática é possível que a produção de seus metabólitos secundários seja influenciada pelo estresse

provocado pelos metais traço. Além disso, como espécie pertencente à família lamiaceae, existe uma expectativa sobre seu potencial para a fitorremediação.

Neste sentido, este estudo teve como objetivo principal, avaliar o potencial do estresse de metais traço em favorecer a produtividade de compostos oriundos do metabolismo secundário de *M. leucocephalus*, bem como o seu potencial como fitorremediadora.

REFERÊNCIAS

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.

Hassanzadeh, M. K.; Emami, S. A.; Asili, J.; Tayarani Najaran, Z. Review of the essential oil composition of Iranian Lamiaceae. *Journal of Essential Oil Research*, v. 23, n. 1, p. 1-40, 2011.

Mafimisebi, T. E.; Oguntade, A. E.; Ajibefun, I. A.; Mafimisebi, O. E.; Ikuemonisan, E. S. The Expanding market for herbal, medicinal and aromatic plants in nigeria and the international scene. *Medicinal & Aromatic Plants*, v. 2, n. 6, 2013.

Nasim, S. A.; Dhir, B. Heavy metal alter the potency of medicinal plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 203, pp. 139-149, 2010.

OMS. WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS), 2010, 446p.

Souza, M. R. M.; Pereira, R. G. F.; Fonseca, M. C. M. Comercialização de plantas medicinais no contexto da cadeia produtiva em Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 14, n. esp, p. 242-245, 2012.

Uprety, Y., Asselin, H., Dhakal, A., Julien, N. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 8, n. 7, 2012.

MMA. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília, MMA/SBF, 2002. 404 p.

Hameed, A.; Qadri, T. N.; Mahmooduzzafar; Siddiqi, T. O. Plant Tolerance and Fatty Acid Profile in Responses to Heavy Metals. In: Ahmad, P. and Prasad, M. N. V. (Ed.). Abiotic Stress Responses in Plants, Springer, New York, pp. 89-104. 2012.

Vamerli, T.; Bandiera, M.; Mosca, G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review, Environmental Chemistry Letters, v. 8, n. 1, pp. 1-17, 2010.

Prasad, M. N. V.; Freitas, H. M. de O. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. Electronic Journal of Biotechnology, v. 6, n. 3, 2003.

Zheljazkov, V. D.; Jeliaskova, E. A.; Kovacheva, N.; Anatoli Dzhurmanski Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter. Environmental and Experimental Botany, v. 64, n. 3, pp. 207-216, 2008.

Seyedsadr, S.; Alipour, Z.T.; Farasat, M.; Sinaki, J. Investigation of the Ability of *Mentha spicata* L. for Reducing Cadmium in Contaminated Soils. International Journal of Agronomy and Plant Production, v.4, n. 12, pp. 3425-3431, 2013.

REFERENCIAL TEÓRICO

Plantas medicinais como fonte de renda para o semiárido

A utilização de práticas tradicionais para tratar de enfermidades pode ser considerada bastante comum. Neste sentido, muitos derivados de plantas são valiosos medicamentos primários e, desta forma, tais espécies são reconhecidas como medicinais. Particularmente nos países em desenvolvimento, boa parte da comunidade depende de meios tradicionais para resolver problemas de saúde. Entretanto, nações desenvolvidas também utilizam práticas tradicionais (especialmente plantas medicinais) para o saneamento das enfermidades. O mercado europeu tem sido considerado o maior consumidor mundial de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos (OMS, 2010).

Em termos globais, as vendas anuais de medicamentos à base de ervas são elevadas e variam entre 7,5 bilhões e 108 bilhões de dólares, sendo que este último valor está associado a medicamentos transformados (Uprety et al., 2012). Adicionalmente, o comércio destas espécies está em expansão desde que novos segmentos de mercado, como os fitoterápicos, e a incorporação em alimentos tem se solidificado. Uma variedade de produtos, tais como comprimidos, cápsulas, chás e óleos surgem a partir do processamento de plantas aromáticas e medicinais (Mafimisebi et al., 2013).

Geralmente o conhecimento empírico das comunidades tradicionais sobre plantas medicinais nativas está bem relacionado ao desenvolvimento de novos fármacos. De fato, muitos fármacos atualmente comercializados têm sua origem a partir destes vegetais. O Bisabolol (levomenol), encontrado em diversas espécies de plantas aromáticas, atualmente é comercializado pelo setor farmacêutico como anti-inflamatório, antispasmodico, antialérgico e vermífugo (Kamatou e Viljoen, 2010); o tamiflu, droga indicada para o tratamento de gripe aviária, tem o ácido chiquimico como ingrediente primário e o *Illicium verum* Hook. f. (anis estrelado) é uma fonte industrial para a extração (Wei et al., 2014); os antitumorais vinblastina e vincristina são extraídos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.; e o antimalárico artemisina tem como fonte a *Artemisia annua* L. (Magalhães, 2006) (Figura 1). Desta maneira, espécies medicinais são comprovadamente fontes para a indústria farmacêutica e seu comércio pode gerar à melhoria da distribuição de riqueza nas suas regiões de origem.

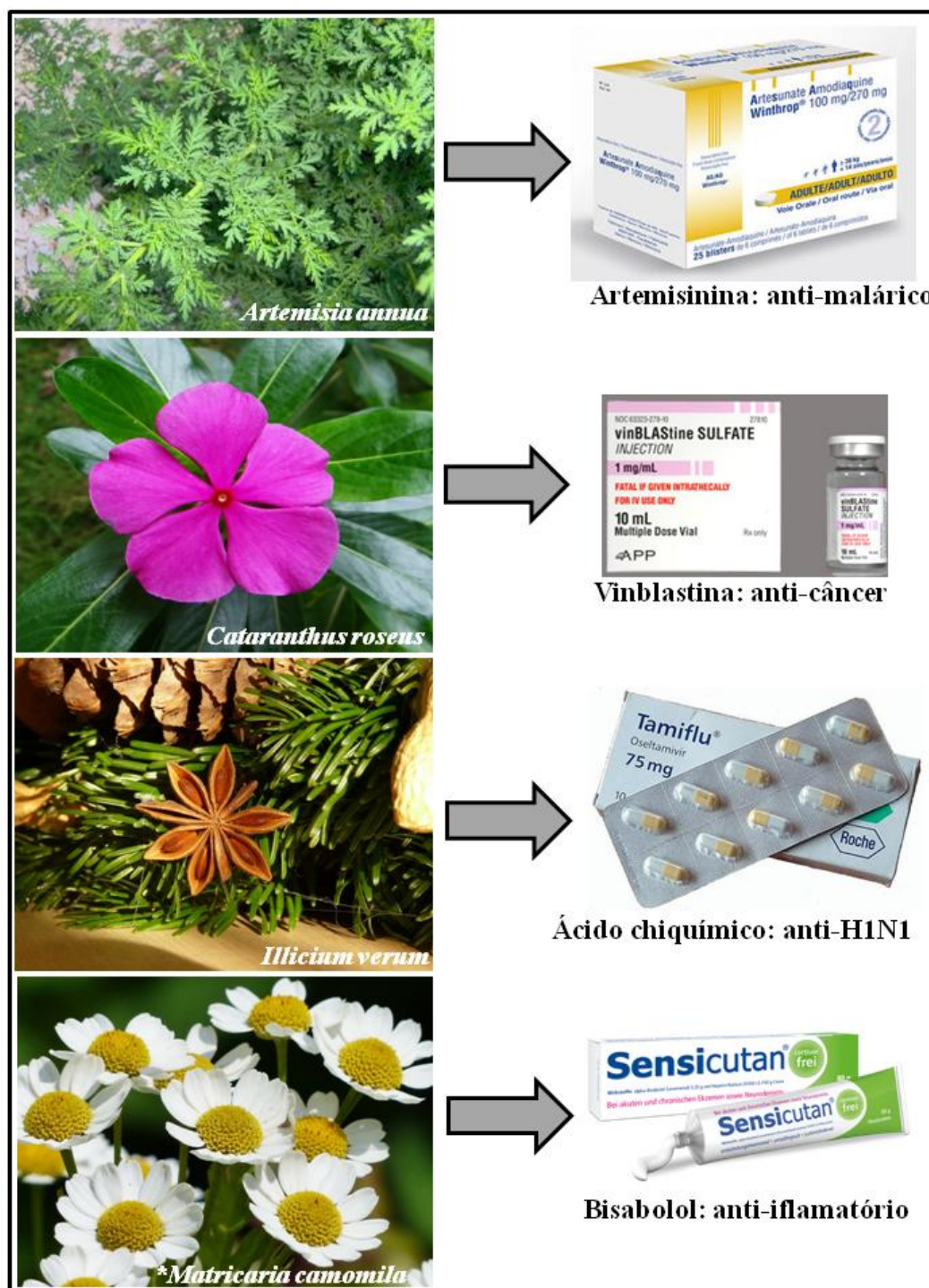


Figura 1. Alguns produtos farmacêuticos elaborados a partir de substâncias sintetizadas por plantas medicinais* . Fontes: Magalhães (2006); Kamatou e Viljoen (2010); Wei et al. (2014).

* Apesar do bilabolol ser isolado a partir de diversas espécies aromáticas, *M. camomila* foi utilizada como exemplo devido ao fato de ter ocorrido primeiramente nesta espécie o isolamento da substância (Kamatou e Viljoen, 2010).

No Brasil, muitas espécies da flora da caatinga são usadas como medicinais por comunidades locais e ultimamente o conhecimento sobre o uso destas espécies tem se expandido dentro da região (Cartaxo et al., 2010). Algumas plantas são inclusive produtos importantes para as comunidades locais como fontes de geração de renda, devido à facilidade com que estes organismos são encontrados e comercializados.

Pela biodiversidade que apresenta, o semiárido brasileiro pode ser considerado uma fonte potencial para a obtenção de espécies medicinais e aromáticas, e consequentemente de novas substâncias com finalidades terapêuticas (Oliveira, 2009). Entretanto, para o sucesso de empreendimentos rurais nessa área falta o acesso a mercados potenciais, o qual ocorre por meio do conhecimento da demanda, definição de padrões de qualidade, quantidades dos produtos e planejamento da produção (Souza et al., 2012). O desconhecimento destas informações ainda é um entrave para o pleno desenvolvimento deste comércio que apresenta grande potencial de geração de renda e promoção da saúde (Souza et al., 2012).

Considerando que a grande maioria das espécies medicinais ainda se encontra em estado silvestre, a domesticação é uma etapa crucial, que poderá garantir padronização de cultivo e da produtividade dos metabólitos secundários, além de possibilitar uma exploração sustentável, com menores riscos para as populações e seus habitats. A maximização da produção destas substâncias também é, obviamente, desejável e necessário. Assim, programas de cultivo comercial destas espécies devem contemplar um conhecimento elevado sobre o crescimento e desenvolvimento, bem como sobre a fisiologia da produção.

Na região semiárida o estudo dos usos tradicionais de plantas e de seus produtos, bem como o desenvolvimento de formas de exploração são mais urgentes devido a questões ambientais, como o alto grau de degradação dos habitats naturais das espécies. Contudo, favorecer a conservação da biodiversidade da Caatinga é uma tarefa complexa, uma vez que distúrbios políticos, econômicos e sociais precisam ser superados.

A inclusão da sustentabilidade no contexto das políticas públicas deve ser fundamental para que ocorra a adoção de modos de uso racionais dos recursos naturais. Além disso, a cultura tradicional deve ser valorizada e associada aos conhecimentos científicos para que ocorra a geração de novas tecnologias. Neste sentido, a realização de estudos relacionados à propagação e cultivo de espécies vegetais com potencial medicinal, validação das suas propriedades curativas e desenvolvimento de produtos é

sempre considerada uma boa alternativa (MMA, 2002). A agregação de valor para as plantas medicinais pode direcionar ao uso mais racional (menos extrativista) desses recursos naturais.

Principais classes de substâncias bioativas sintetizadas por plantas medicinais e aromáticas

As substâncias associadas à ação terapêutica de plantas medicinais e aromáticas são coadjuvantes em relação às oriundas do metabolismo primário, como proteínas, aminoácidos, carboidratos e ácidos nucleicos. Não obstante, os esqueletos de carbono encontrados nos produtos naturais são derivados das rotas primárias do metabolismo, incluindo a glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico e a via das pentoses fosfato.

Os vários tipos de metabólitos secundários produzidos pelas plantas com importante potencial para a exploração humana apresentam características estruturais típicas e origens metabólicas específicas. Terpenos e fenilpropanoides são consideradas importantes classes de compostos secundários e podem ser definidos conforme Kumar et al., (2015):

Terpenoides – constituem o maior grupo de produtos naturais e são formados por meio da condensação de unidades isoprênicas com cinco carbonos (5C), o isopentenil pirofosfato (IPP). As várias classes de terpenoides são sintetizadas em dois subcompartimentos dentro da célula vegetal. Monoterpenos (C10), diterpenos (C20), e carotenoides (C40) são geralmente formados dentro dos plastídios, através da via da desoxi-D-xilulose fosfato (DOXP), enquanto sesquiterpenos (C15) e triterpenos (C30) são formados dentro do citoplasma a partir da rota do mevalonato (MVA) (Figura 2). Nos óleos essenciais são encontrados predominantemente monoterpenos e sesquiterpenos (Frans, 2010) (Figura 2).

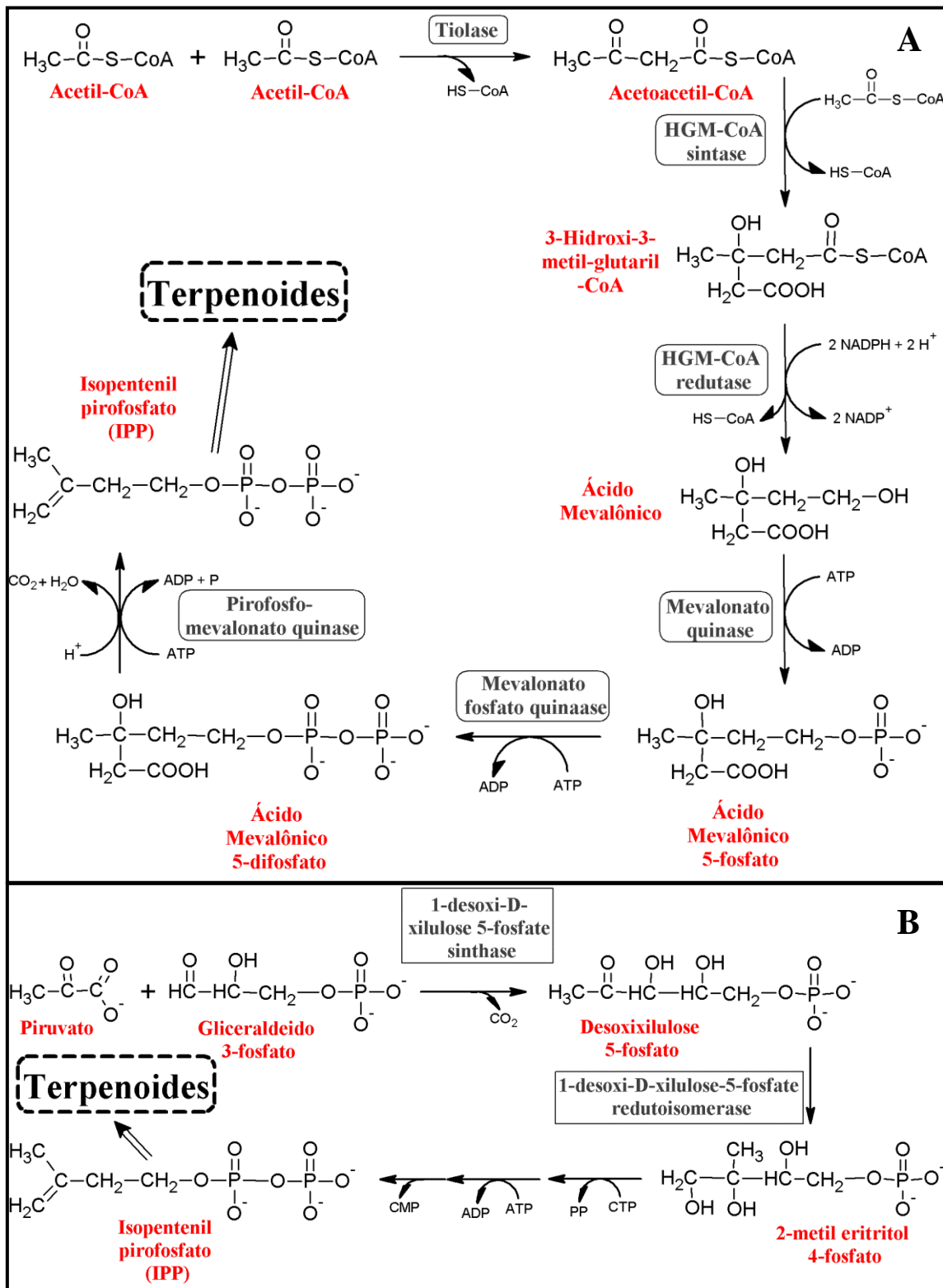


Figura 2. Vias de síntese do isopentenil pirofosfato (IPP), molécula precursora dos terpenos, conforme Dewick (2009). A via do ácido mevalônico ocorre no citoplasma (A), enquanto a via da desoxixilulose fosfato ocorre nos plastos (B). HGM-CoA sintase: 3 hidroxi-3-metil-glutaril-CoA sintase.

Fenilpropanoides – Também referidos como fenólicos, são geralmente derivados dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, sintetizados através via do chiquimato (Figura 3). O nome da via faz referência ao intermediário central da rota, o chiquimato. Os fenilpropanoides podem ter baixa massa molecular, e serem solúveis em água ou polimerizados em estruturas macromoleculares muito grandes, por exemplo, taninos, lignina e suberina. Contudo, a principal classe de fenólicos encontrados nas plantas é a dos flavonoides (Taiz e Zeiger, 2013). Alguns fenólicos de baixo peso molecular são voláteis e encontrados em óleos essenciais de muitas espécies. Neste sentido, tem sido inclusive proposto a classificação dos óleos essenciais em dois grupos: os que apresentam terpenoides predominantemente e aqueles contendo principalmente derivados do chiquimato (aromáticos) (Dewick, 2009).

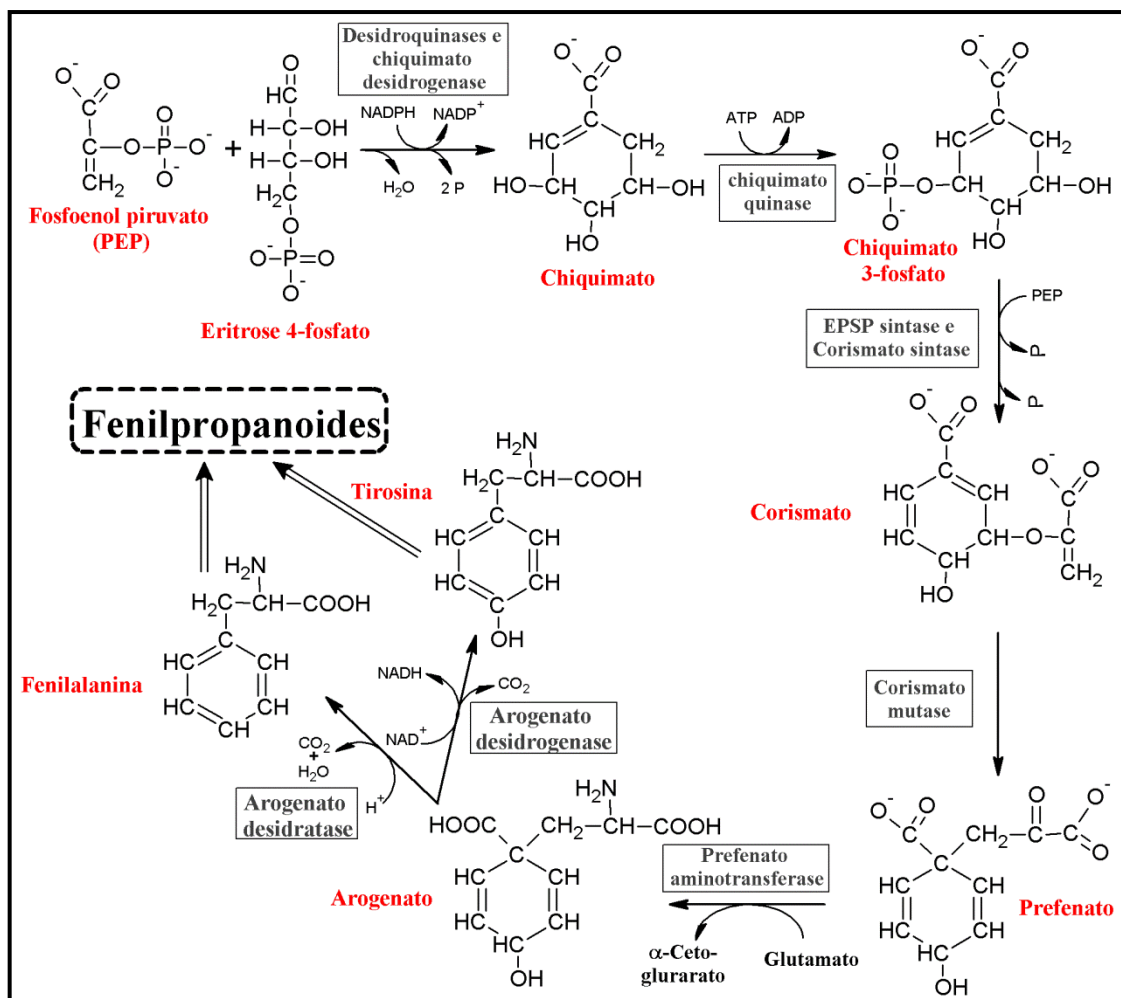


Figura 3. Via do chiquimato para a síntese dos fenilpropanoides nas plantas conforme Dewick (2009). EPSP sintase: 5-enolpiruvilchiquimato-3-phosphate sintase.

Alcaloides – são metabolitos secundários de baixo peso molecular e heterocíclicos contendo o nitrogênio como heteroátomo. Os alcaloides são principalmente derivados de aminoácidos e sua grande diversidade corrobora com uma variedade de vias de síntese (Ziegler e Facchini, 2008).

Importância medicinal da família Lamiaceae e de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore

Uma boa fonte de pesquisa no âmbito das plantas medicinais é encontrada em Lamiaceae, uma grande família botânica com distribuição cosmopolita, encontrada em diversos habitats: regiões alpinas, pradarias, bosques, florestas, áreas áridas e costeiras. Esta família é composta por ervas, arbustos e árvores, apresentando caules jovens quadrangulares, grande número de tricomas glandulares e flores bilabiadas com cinco pétalas (Mendes, 2007). Plantas desta família são aromáticas e incluem muitas ervas conhecidas, tais como *Ocimum* (manjeriço), *Mentha* (hortelã), *Rosmarinus* (alecrim), *Salvia* (sálvia) e *Origanum* (orégano). Segundo Harley e Pastore (2012), a família Lamiaceae contém 240 gêneros e aproximadamente 7.200 espécies. No Brasil, existem 32 gêneros e aproximadamente 496 espécies nativas ou naturalizadas (Harley, 2012).

O metabolismo secundário dessa família apresenta uma grande variedade de classes de moléculas, existindo representantes da via do ácido acético, da via do ácido chiquímico e provenientes de biossíntese mista (Falcão e Menezes, 2003). Diversos tipos de fenóis e terpenoides são encontrados nos óleos essenciais de espécies desta família. Além dos componentes do óleo, ainda são encontrados diterpenoides e triterpenóides, alcaloides, compostos fenólicos entre outras substâncias (Hassanzadeh et al., 2011). Estudos sobre as propriedades biológicas de espécies de Lamiaceae têm identificado uma variedade de atividades valiosas, tais como antioxidantes, antimicrobianas e antivirais (Falcão e Menezes, 2003). Assim, existe um grande interesse no estudo de plantas desta família, desde que potencialmente se apresentam como um reservatório de substâncias com caráter farmacológico.

Incluído em Lamiaceae, *Hyptis* Jacquin também é tido como um importante grupo de plantas associadas à produção de compostos bioativos. No Brasil o centro da diversidade desse gênero se encontra nos campos cerrados do Brasil Central, mais especificamente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás, com algumas espécies

exclusivamente brasileiras (Bordignon, 1990). Ao gênero *Hyptis* tem sido creditado a ocorrência de uma extensa lista de espécies que produzem variados compostos químicos, com importantes propriedades farmacológicas, tais como antimicrobiano e citotóxico, antifúngica, anti-inflamatória e anti-HIV (Falcão e Menezes, 2003).

Os metabólitos secundários deste grupo são predominantemente oriundos da via do acetato-mevalonato, podendo ser encontradas substâncias de origem biossintética mista e da via do ácido chiquímico (Falcão e Menezes, 2003). O potencial medicinal das espécies deste grupo normalmente está associado à produção de terpenoides, componentes principais dos óleos essenciais. Em adição, várias substâncias foram identificadas, tais como hidrocarbonetos, ácidos graxos, esteróides. Outros compostos em menor proporção também caracterizam fitoquimicamente estas plantas, tais como, flavonoides (origem biossintética mista) e outros fenolicos. As lignanas, por exemplo, são responsáveis por boa parte das atividades citotóxicas apresentadas por algumas espécies (Falcão e Menezes, 2003).

O gênero *Hyptis* passou por uma reclassificação, derivando como novo gênero *Martianthus* Harley & J.F.B. Pastore (Harley e Pastore, 2012). Conforme os autores, das quatro espécies incluídas neste gênero, três são restritas às regiões semiáridas do nordeste brasileiro: *Martianthus sancti-gabrielii* (Harley) Harley & J.F.B. Pastore, *Martianthus stachydifolius* (Epling) Harley & J.F.B. Pastore e *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore.

Estudos realizados com *M. leucocephalus* demonstram potencial fitoquímico e econômico relevante. O óleo essencial extraído das folhas desta espécie apresenta rendimento médio de 0,2% e o formiato de isobornila como composto majoritário (Lucchese et al., 2005). Uma avaliação sobre a atividade antimicrobiana desse óleo essencial demonstrou efeito frente a *Bacillus cereus*, *Stafilococcus aureus*, *Candida albicans* (Lucchese et al. 2005); *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus schleiferi*, *Salmonella thiphi*, *Escherichia coli*, *Burkholderia* sp., *Klebsiella pneumoniae* e também contra os fungos fitopatogênicos *Sclerotinium rolfis* e *Rhizoctonia solani* (Santos et al., 2011). Assim, pesquisas que avaliem o potencial produtivo *M. leucocephalus* são importantes.

O contexto dos metais traços nas plantas e a fitorremediação

Metais traço são elementos que caracteristicamente ocorrem em baixíssimas concentrações no ambiente. Muitos dos elementos que se enquadram neste conceito são considerados tóxicos, mesmo em pequenas concentrações, como o cádmio (Cd), chumbo (Pb) e o mercúrio (Hg). Outros elementos, porém, são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento dos organismos, sendo desta forma, descritos como micronutrientes. Por exemplo, metais como o cobre (Cu) e o zinco (Zn) são considerados nutrientes essenciais para as plantas, e assim, importantes cofatores de muitas enzimas celulares, entre outras funções (Yadav, 2010). Assim, o problema de toxicidade normalmente é discutido como uma questão de quantidade, sendo variável para cada elemento (Zovko e Romić, 2011).

Metais traço podem ser encontrados nos solos como reflexo de processos naturais, ou terem seus níveis aumentados devido a ação humana. Várias fontes antrópicas significantes, tais como fertilizantes, lodo de esgoto, defensivos agrícolas, resíduos de subprodutos industriais e à qualidade das águas de irrigação têm contribuído para o aumento dos níveis destes elementos nos solos agrícolas (Kabata-Pendias, 2011).

Estes elementos apresentam elevado potencial para alcançar a biota e por meio da cadeia alimentar podem ser transferidos para os diversos nichos ecológicos. Assim, o acúmulo destes elementos no solo é tido como perigoso. Os efeitos tóxicos dos metais traços estão associados à interferência nos processos bioquímicos normais. Nas condições fisiológicas muitos destes elementos são convertidos aos seus estados de oxidação mais estáveis e combinam-se com biomoléculas, tais como proteínas e enzimas, gerando moléculas fisiologicamente inoperantes (Duruibe et al., 2007).

Quando os vegetais são expostos a níveis tóxicos destes metais (Tabela 1) diversos distúrbios que afetam seu crescimento e o desenvolvimento podem ser verificados. A própria manutenção das plantas nestas condições frequentemente origina um aumento na demanda por energia metabólica e, desta maneira, o crescimento pode ser fortemente limitado (Kabata-Pendias, 2011). Adicionalmente, tem sido relatada a ocorrência de redução do alongamento celular e da taxa fotossintética devido à redução do conteúdo de clorofila, distúrbios no metabolismo do nitrogênio, alterações na atividade de diversas enzimas, e redução da captação de água e nutrientes, que está associada a alterações no desenvolvimento das raízes (Yadav, 2010).

Tabela 1. Concentrações de Cd, Cu e Zn verificadas na solução do solo e nas folhas de plantas de diversas espécies de acordo com Kabata-Pendias, 2011.

Metal	Faixa de concentração na solução do solo*	Quantidade suficiente ou normal nas folhas	Quantidade tóxica nas folhas
Cádmio (Cd)	0,2–300 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,05–0,2 mg kg^{-1}	5–30 mg kg^{-1}
Cobre (Cu)	1–135 $\mu\text{g L}^{-1}$	2–5 mg kg^{-1}	20–100 mg kg^{-1}
Zinco (Zn)	21 e 570 $\mu\text{g L}^{-1}$	27–150 mg kg^{-1}	100–400 mg kg^{-1}

* Medido em várias soluções de solo por meio de técnicas diferentes (Kabata-Pendias, 2011).

Os solos apresentam grande importância econômico-social e desta maneira a gestão da sua qualidade é considerada um ponto chave (Zovko e Romić, 2011). Neste sentido, alguns trabalhos demonstram que as plantas são eficazes para extrair e acumular metais dos solos por meio de um processo denominado de fitorremediação (Favas et al., 2014).

A fitorremediação de metais pode ocorrer por principalmente por meio de duas possibilidades dependendo das características da planta (Cui et al., 2007). A estimativa do fator de translocação ($FT = \text{Concentração do metal na parte aérea} / \text{Concentração do metal na raiz}$) e do fator de bioacumulação ($FB = \text{Concentração do metal em uma das partes da planta} / \text{Concentração do metal no ambiente}$) permite determinar a aplicabilidade de uma espécie para fins de fitorremediação (Vamerali et al., 2010):

Fitoextração: As plantas absorvem, translocam e acumulam os metais na parte aérea. Apresentam valores do FT acima de 1 e, desta forma, contém o metal mais concentrado na parte aérea do que nas raízes (Ali et al., 2013) (Figura 4).

Fitoestabilização: As plantas limitam a mobilidade e a biodisponibilidade dos metais no solo por meio das raízes. Apresentam FB acima de 1, possuindo o metal mais concentrado nos tecidos do que no ambiente (essencialmente por meio das raízes) (Ali et al., 2013) (Figura 4).

A fitorremediação tem sido considerada uma técnica promissora que pode ser usada para remediação de solos contaminados com metais traços. Assim pesquisas que avaliem o potencial de espécies vegetais para a fitorremediação apresentam considerável relevância social e econômica (Laghlimi et al., 2015).

Potencialização da produtividade de metabólitos secundários

As substâncias associadas à ação terapêutica de plantas medicinais são coadjuvantes em relação às oriundas do metabolismo primário, como proteínas, carboidratos e aminoácidos, sendo normalmente encontradas em quantidades mínimas nos tecidos vegetais. Entretanto, muitos destes compostos são considerados valiosos por possuírem importância farmacológica, alimentícia e para a indústria em geral. Desta forma, estudos direcionados à implementação ou aprimoramento da sistemática de produção agrícola de plantas medicinais e aromáticas e de seus compostos apresenta considerável relevância.

Neste sentido, pesquisas envolvendo plantas medicinais sinalizam que a produção dos metabólitos secundários é influenciada pelas condições de cultivo. Em várias espécies, fatores como variabilidade genética intraespecífica, condições ambientais, épocas de colheita, e condições do solo modificam a quantidade e a qualidade de diversos compostos, tais como isoprenóides, fenólicos e alcalóides (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Os efeitos das condições de cultivo sobre a produção de óleos essenciais em espécies aromáticas têm sido bem documentados. Tavares (2009) observou que a produtividade do óleo essencial da erva cidreira variou em função das épocas de colheita. Em outro estudo, David et al. (2007) indicaram que menores níveis de fósforo em solução nutritiva culminaram em maior rendimento no óleo essencial de hortelã pimenta. Sob diferentes doses de potássio, *Mentha x gracilis* apresentou variações na biossíntese do óleo essencial, sendo sugerido que a atividade de enzimas envolvidas na rota metabólica dos monoterpenos tenha sido afetada (Garlet et al., 2007). Desta forma, a avaliação de plantas medicinais e aromáticas sob diferentes tipos de cultivo pode ser uma útil ferramenta para melhorar a produtividade das espécies.

Considerando esta perspectiva, pouca atenção tem sido dada as alterações provocadas por metais traço (os quais ocorrem em baixas quantidades nos sistemas vivos) sobre os constituintes ativos das plantas medicinais (Nasim e Dhir, 2010). Geralmente, a extensa literatura discutindo os efeitos de metais traço sobre a fisiologia e bioquímica de vegetais foca no fato destes elementos serem um dos maiores problemas que afeta a produtividade agrícola (Yadav, 2010).

Por outro lado, alguns trabalhos envolvendo plantas medicinais sinalizam que os metabólitos secundários são importantes para a fisiologia destes organismos durante o estresse causado por metais (Nasim e Dhir, 2010). Além disso, desde que a absorção de alguns metais pode afetar muitos aspectos da fisiologia das plantas, direta ou indiretamente, a produção de metabólitos secundários também pode ser influenciada através do aumento dos níveis de metais pesados (Li et al., 2013). Os resultados podem ser diferentes considerando diversos fatores, incluindo a espécie avaliada (Nasim e Dhir, 2010). Entretanto, muitas plantas sintetizam e acumulam os metabólitos secundários após tratamento com os metais (Mithöfer et al. 2004). Plantas de *Mentha arvensis* L., expostas ao Zn, apresentaram um aumento nos teores de óleo essencial e de mentol (Misra, 1992). Kumar et al. (2004) verificaram que propágulos de *Pluchea lanceolata* (DC.) Oliv. & Hiern, demonstram incrementos na produção do fenólico quercetina, após exposição ao Cu e ao Zn. Adicionalmente, em *Salvia miltiorrhiza* Bunge, cultivadas em solos contendo elevadas concentrações de Cd, foram verificados acúmulo de compostos hidrossolúveis e lipossolúveis (Li et al., 2013), e em duas cultivares de sorgo, expostas ao alumínio, ocorreu aumento na produção de fenólicos totais (Peixoto et al., 2007).

Uma explicação para estes efeitos provocados pelo estresse por metais ainda carece de maiores estudos (Nasim e Dhir, 2010). Contudo, alterações nas vias de sinalização para a ativação genética da síntese de compostos secundários podem fornecer algumas sugestões. O processo de transdução de sinais nestas vias é complexo, mas, alguns dos componentes envolvidos têm recebido maior atenção no contexto do estímulo provocado pelos estresses. O papel destes componentes pode ser descrito conforme Zhao et al. (2005):

Espécies reativas de oxigênio (EROS) – exercem influência em vários mecanismos de defesa da planta. Em alguns casos as EROS podem ser suficientes para a indução do acúmulo de metabólitos secundários. Estas substâncias influenciam a expressão de muitos genes, tais como aqueles ligados a sesquiterpenos ciclases e fenilalanina amônia liase (PAL). Contudo, ação das EROS também pode desencadear a peroxidação lipídica enzimática ou não enzimática e iniciar a via que conduz à biossíntese de oxilipinas, como o ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido jasmônico e compostos relacionados, os quais induzem a síntese dos compostos secundários.

Ácido Jasmônico (JA) – O Ácido jasmônico e os seus compostos relacionados têm sido considerados transdutores de sinais de eliciadores para a produção de

metabolitos secundários de plantas. A via de sinalização do JA é considerada um sinal integrante para a biossíntese e acúmulo dos diversos compostos secundários, desde que afeta todas as classes de substâncias (terpenóides, alcalóides, e fenilpropanóides). A ocorrência de estimulação endógena para a biossíntese endógena JA, quando as plantas são expostas a diversos eliciadores, demonstram sua importância como um mediador da ação destes eliciadores na síntese de compostos secundários.

Etileno – é um fitormônio que regula vários processos nas plantas e sua produção pode ser induzida por vários tipos de estresses. Apesar de o etileno ser essencial nas vias de sinalização que ativam mecanismos de defesa esta molécula não é um sinal comum para a indução de metabolismo secundário das plantas. Ocorrem alguns casos em que a acumulação de metabolitos secundários nas plantas é afetada pelo etileno. O tratamento de etileno pode provocar aumento dos flavonóides, antocianinas e estilbenos através de regulação de seus genes biossintéticos. Mesmo considerando que o etileno influencia a produção de alguns metabolitos secundários, a interação com a via de sinalização JA parece ser mais efetiva.

Considerando a influência dos metais sobre estes componentes de sinalização, algumas teorias têm sido propostas para explicar o potencial eliciador deste tipo de estresse na biossíntese e acúmulo dos compostos secundários. O aumento da produção EROS é um fenômeno comum nos vegetais submetidos aos estresses por metais. Estas espécies químicas podem desencadear o incremento de moléculas sinalizadoras, como as oxilipinas (precursores do jasmonato), e assim induzir a expressão gênica para a biossíntese e acumulação dos compostos secundários (Nasim e Dhir, 2010) (Figura 4). Adicionalmente, a biossíntese do JA (através do precursor OPDA) e do etileno também podem atuar na ativação indireta dos genes envolvidos na biossíntese dos compostos secundários (Nasim e Dhir, 2010). Também é provável que os metais traço ajam como eliciadores por influenciarem de forma direta a produção do JA (Dar et al., 2015).

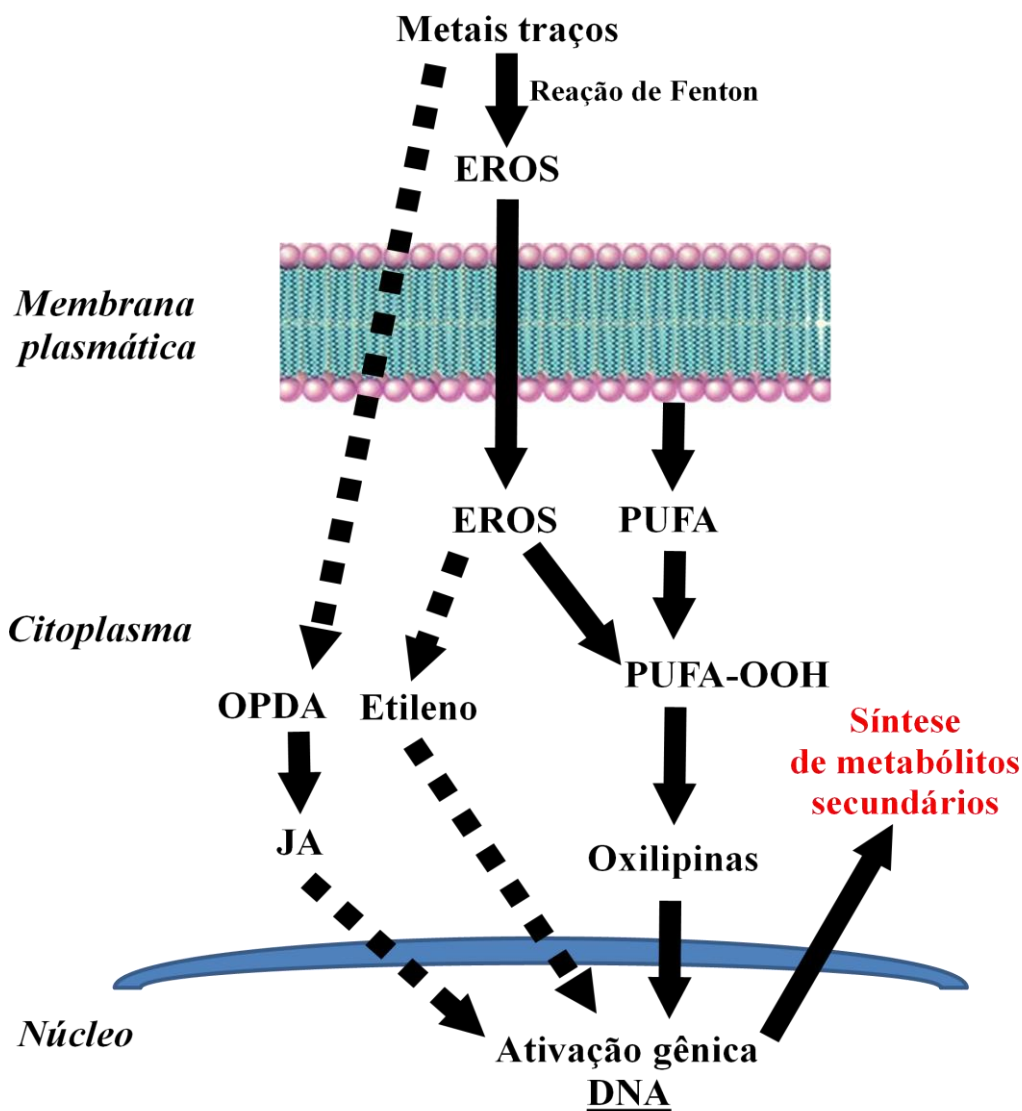


Figura 4. Influência dos metais nas vias de sinalização para a ativação de genes associados à síntese de compostos secundários conforme Nasim e Dhir (2010). Linhas tracejadas sugerem que a ativação gênica por meio do etileno e ácido 12-oxo-fitodienico (OPDA) ocorre de forma indireta. PUFA: ácidos graxos poliinsaturados, PUFA-OOH: ácidos graxos poliinsaturados pós peroxidação, EROS: espécies reativas de oxigênio.

Outra possível explicação para a influência do estresse por metais sobre a produção dos metabólitos secundários nas plantas pode estar associada ao fato de que o fechamento estomático é um efeito fisiológico comum (Appenroth, 2010). Devido ao aumento da resistência à difusão, a concentração de CO_2 diminui e menos $\text{NADPH}+\text{H}^+$ é utilizado no ciclo de Calvin para a fixação e redução de CO_2 nas folhas de plantas estressadas. Desta maneira, uma quantidade maior de energia a ser dissipada na forma

de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ favorece a síntese de produtos naturais altamente reduzidos (Selmar e Kleinwächter, 2013) (Figura 5).

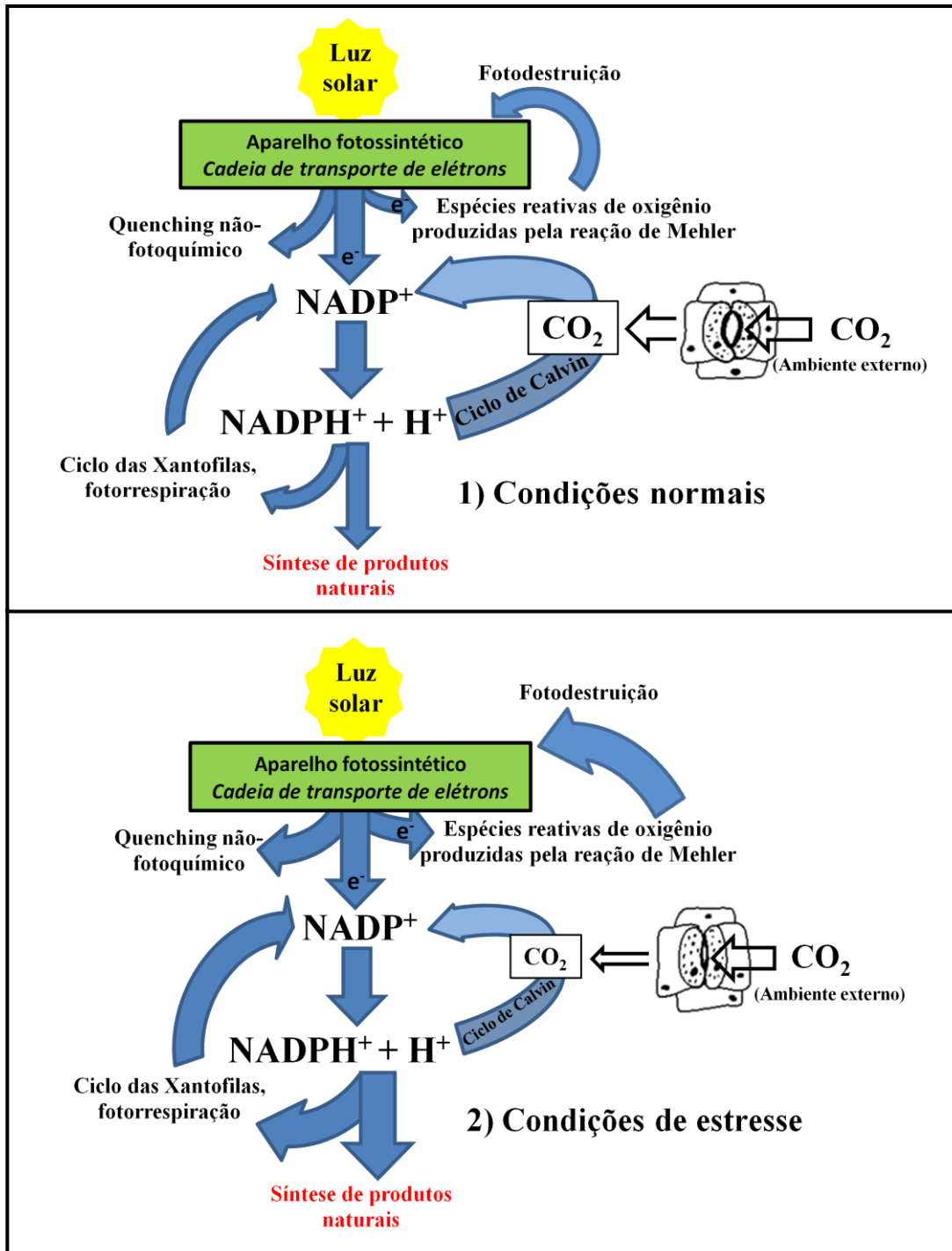


Figura 5. Modelo proposto por Selmar e Kleinwächter (2013) como possível explicação para o incremento de compostos naturais em plantas submetidas a estresses ambientais. Nas plantas submetidas às condições de estresse, a maior resistência estomática favorece a síntese dos compostos naturais.

Um aumento dos teores de metabolitos secundários pode ser um mecanismo fisiológico vantajoso para plantas estressadas. Terpenos e compostos fenólicos podem atuar como agentes antioxidantes contra o estresse oxidativo induzido pelos metais (Hemmerlin et al., 2012; Izbiańska et al., 2014). Além disso, alguns estudos indicam a possibilidade da planta utilizar os precursores de metabólitos secundários como doadores de elétrons, fundamentais na diminuição ou eliminação do estresse oxidativo. Em *Artemisia annua* exposta ao Al^{3+} , por exemplo, Aftab et al. (2010) encontraram considerável aumento nos teores do sesquiterpeno artemisina correlacionado com o aumento dos níveis de H_2O_2 . Este e outros estudos mostraram que o precursor da artemisina, a diidroartemisina, age como detoxificador do H_2O_2 (Aftab et al., 2010 e Li et al., 2012).

Em adição, os compostos fenólicos constituem uma das linhas de defesa em vários estresses ambientais, seja como substrato para as peroxidases, como reforço da parede celular (monômeros da lignina) e/ou como quelantes de íons metálicos (Wang et al., 2011; Chang et al., 2012). Danos provocados pelo estresse por metais pesados podem gerar microlesões em tecidos vegetais e, neste caso, muitas vezes, ocorre a produção de fitoalexinas, tais como flavonoides e taninos (Lummerzheim et al., 1995).

Os resultados destes trabalhos denotam a importância de se avaliar espécies vegetais com potencial medicinal sob exposição aos metais traço. Pesquisas nesta linha podem gerar novas perspectivas para a utilização comercial dessas espécies, subsidiar programas de melhoramento e melhorar sistemas de cultivo.

REFERÊNCIAS

Aftab, T.; Khan, M. M. A.; Idrees, M.; Naeem, M. Effects of aluminium exposures on growth, photosynthetic efficiency, lipid peroxidation, antioxidant enzymes and artemisinin content of *Artemisia annua* L. *Journal of Phytology*, v. 2 n. 8, p. 23-37, 2010.

Appenroth K. J. Definition of “heavy metals” and their role in biological systems. In: Sherameti I., Varma A. (eds.) *Soil heavy Metals, Soil Biology*. Berlin: Springer; 2010, v.19, pp. 19-29.

Bordignon, S. A. L. O gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, UFRGS, Porto Alegre. 1990, 123p.

Cartaxo, S. L.; de Almeida Souza, M. M.; de Albuquerque, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131 n. 2, pp. 326-342, 2010.

Chang, M-L.; Chen, N-Y.; Liao, L-J.; Cho, C-L.; Liu, Z-H. Effect of cadmium on peroxidase isozyme activity in roots of two *Oryza sativa* cultivars. *Botanical Studies*, v. 53, p. 31-44, 2012.

Dar, T. A.; Uddin, M.; Khan, M. M. A.; Hakeem, K. R.; Jaleel, H. Jasmonates counter plant stress: A Review. *Environmental and Experimental Botany*, v. 115, p. 49-57, 2015.

David, E. de F. S.; Mischan, M. M.; Boaro, C. S. F. Desenvolvimento e rendimento de óleo essencial de menta (*Mentha x piperita* L.) cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. *Revista Biotemas*, v. 20, n. 2, p. 15-26, 2007.

Dewick, P. M., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3 ed. John Wiley and Sons, Ltda, 2009, 550p.

Falcão, D. C.; Menezes, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

Franz, C. M. Essential oil research: past, present and future. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 25, n. 3, pp. 112-113, 2010.

Garlet, T. M. B.; Santos, O. S.; Apel, M. A.; Flores, R. Teor e qualidade do óleo essencial de *Mentha x gracilis* Sole (Lamiaceae) cultivada em hidroponia. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, n. supl. 2, p. 114-116, 2007.

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.

Harley, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. *Rodriguésia*, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.

Harley, R. M.; Pastore, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa*, v. 58, p. 1-55, 2012.

Hassanzadeh, M. K.; Emami, S. A.; Asili, J.; Tayarani Najaran, Z. Review of the essential oil composition of Iranian Lamiaceae. *Journal of Essential Oil Research*, v. 23, n. 1, p. 1-40, 2011.

Hemmerlin, A.; Harwood, J. L.; Bach, T. J. A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Progress in Lipid Research*, v. 51: n. 2, p. 95-148, 2012.

Izbianska, K.; Arasimowicz-Jelonek, M.; Deckert, J. Phenylpropanoid pathway metabolites promote tolerance response of lupine roots to lead stress. *Ecotoxicology and Environmental safety*, v.110, p. 61-67, 2014.

Kabata-Pendias, A.. Trace elements in soils and plants. 4 ed. CRC Press. Taylor and Francis Group, 2011, 505p.

Kamatou, G. P. P.; Viljoen, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.

Kumar, S.; Narula, A.; Sharma, M. P.; Srivastava, P. S. In vitro propagation of *Pluchelanceolata*, a medicinal plant, and effect of heavy metals and different aminopurines on quercetin content. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 40, n, 2, p. 171-176, 2004.

Kumar, S., Gupta, N.; Kumar, S.; Yadav, V.; Prakash, A.; Gurjar, H. Metabolites In Plants And Its Classification. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 4, n. 1, 2015.

Li, X.; Zhao, M.; Guo, L.; Huang, L. Effect of cadmium on photosynthetic pigments, lipid peroxidation, antioxidants, and artemisinin in hydroponically grown *Artemisia annua*. Journal of Environmental Sciences, v. 24, n. 8, p. 1511-1518, 2012.

Li, X.; Wang, S.; Guo, L.; Huang, L. Effect of cadmium in the soil on growth, secondary metabolites and metal uptake in *Salvia miltiorrhiza*. Toxicological & Environmental Chemistry, v. 95, n. 9, 1525-1538, 2013.

Lucchese, A. M. Oliveira, L. S.; Rodrigues, O. S.; Moreira, J. S.; Zaim, C. Y. H.; Zaim, M. H.; Queiroz, L. P.; Giulietti, A. M.; Uetanabaro, A. P. T.; Conceicao, T. A. Óleos essenciais do gênero *Hyptis* da região do semi-árido da Bahia. In: Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 3. 2005, Campinas, Anais... Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2005. p.118.

Lummerzhein, M.; Sandroni, M.; Castresana, C.; Oliveira, D. de; Roby, D.; van Montagu, M. Comparative microscopy and enzymatic characterization of the leaf necrosis induced in *Arabidopsis thaliana* by lead nitrate and by *Xantomonas campestris* pv. *Campestris* after lead nitrate spray. Plant Cell and Environment, v. 18, n. 5, p. 488-509, 1995.

Mafimisebi, T. E.; Oguntade, A. E.; Ajibefun, I. A.; Mafimisebi, O. E.; Ikuemonisan, E. S. The Expanding market for herbal, medicinal and aromatic plants in nigeria and the international scene. Medicinal & Aromatic Plants, v. 2, n. 6, 2013.

Magalhães, V. G. Convenção sobre a Diversidade biológica (cdb): A necessidade da revisão do seu texto substituindo o termo “recursos genéticos” por “recursos biológicos” nos arts 1, 9, 15, 16 e 19. Revista eletrônica do curso de direito da UFSM, v. 1, n. 1, p. 16-32, 2006.

Mendes, M. D. de S. Caracterização química e molecular de espécies das famílias Lamiaceae e Apiaceae da flora aromática de Portugal. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia. Universidade de Lisboa, 2007.

Misra, A. Effect of zinc stress in Japanese mint as related to growth, photosynthesis, chlorophyll content and secondary plant products – the monoterpenes. *Photosynthetica*, v. 26, pp. 225-234, 1992.

Mithöfer, A.; Schulze, B.; Boland, W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*, v. 566, pp. 1-5, 2004.

MMA. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília, MMA/SBF, 2002. 404 p.

Nasim, S. A.; Dhir, B. Heavy metal alter the potency of medicinal plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 203, pp. 139-149, 2010.

Oliveira, M. L. M. de. Efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm. Sobre a inflamação tópica e a cicatrização de feridas cutâneas. Dissertação de mestrado. UECE, Fortaleza, 2009.

OMS. WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS), 2010, 446p.

Peixoto, P. H. P.; Pimenta, D. S.; Cambraia, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. *Bragantia*, v. 66, n. 1, p. 17-25, 2007.

Santos, S. N.; Castanha, R. F.; Silva, J. L.; Marques, M. O. M.; Scramin, S.; Melo, I. S. de. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Hyptis leucocephala* In: Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 2011, Campinas. Anais. Campinas, EMBRAPA, 2011. Resumo BIO-10, p. 70.

Selmar, D.; Kleinwächter, 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, pp. 817-826, 2013.

Souza, M. R. M.; Pereira, R. G. F.; Fonseca, M. C. M. Comercialização de plantas medicinais no contexto da cadeia produtiva em Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 14, n. esp, p. 242-245, 2012.

Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

Tavares, I. B. Propagação vegetativa, adubação orgânica e idades de colheita de quimiotipos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown]. Dissertação de Mestrado, Fundação UFT, Gurupi, 2009. 85p.

Uprety, Y., Asselin, H., Dhakal, A., Julien, N. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 8, n. 7, 2012.

Wang, C.; Lu, J.; Zhang, S. H.; Wang, P. F.; Hou, J.; Qian, J. Effects of Pb stress on nutrient uptake and secondary metabolism in submerged macrophyte *Vallisneria spiralis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, n. 5, p. 1297-1303, 2011.

Wei, L.; Hua, R.; Li, Maoye.; Huang, Y.; Li, S.; He, Y.; Shen, Z. Chemical composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. *Journal of Insect Science* v. 14, n. 80, 2014.

Yadav, S.K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, v. 76, 167-179, 2010.

Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 23, pp. 283-333, 2005.

Ziegler, J.; Facchini, P. J. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, pp. 735-769, 2008.

CAPÍTULO 1

Crescimento e teor de compostos voláteis de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetida ao estresse por metais¹

¹ Artigo submetido à revista Ciência Rural com menores correções a serem realizadas.

Crescimento e teor de compostos voláteis de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetida ao estresse por metais

Growth and volatile compounds of *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.)

JFB Pastore subjected to heavy metal stress

RESUMO

M. leucocephalus é encontrada no semiárido nordestino e apresenta elevado potencial farmacológico atribuído a produção de compostos voláteis. Apesar da importância, poucos são os estudos sobre os fatores que possam estimular a produtividade desta espécie. Com o trabalho objetivou-se avaliar o efeito do estresse provocado por Cu, Cd e Zn no crescimento dessa espécie e na produção de compostos voláteis. Estacas apicais foram transferidas para bandejas plásticas contendo 6,0 L de solução nutritiva, para o enraizamento. Após, foram submetidas a doses de Cd, Cu e Zn, durante 15 dias. Todos os metais avaliados reduziram a suculência e o crescimento de *M. leucocephalus*, enquanto que o Zn aumentou o teor de compostos voláteis produzido pelas plantas.

Palavras chave: Lamiaceae, metais, crescimento relativo.

ABSTRACT

M. leucocephalus is found in the brazilian northeastern semi-arid and has a high pharmacological potential attributed to production of volatile compounds. Despite importance, there are few studies on the factors that can stimulate productivity of this specie. With this work aimed to investigate the effect of Cu, Cd and Zn stress in the growth of this specie and the production of volatile compounds. Apical cuttings were transferred to plastic trays containing 6.0 L of nutrient solution for rooting. After, they were exposed to doses of Cd, Cu and Zn, for 15 days. All the metals reduced succulence

and growth of *M. leucocephalus*, while Zn increased the content of volatile compounds produced by plants.

Key words: Lamiaceae, metals, relative growth.

INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae apresenta ampla utilização em diversas partes do mundo, tanto como plantas medicinais quanto na culinária. Diversas espécies, como alecrim (*Rosmarinus* sp.), manjeriço (*Ocimum* sp.) e menta (*Mentha* sp.) têm uso já consagrado em diversas regiões (MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007). Nesta família, o gênero *Hyptis* possui considerável relevância, em virtude da capacidade de produzir uma ampla variedade de compostos orgânicos de importância farmacológica (FALCÃO & MENEZES, 2003).

M. leucocephalus, anteriormente designada *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth, é uma espécie de ocorrência restrita ao semiárido, de elevado potencial fitoquímico e econômico (OLIVEIRA et al., 2011), atribuído à presença de compostos voláteis, comumente chamados de óleos essenciais. Segundo LUCCHESI et al. (2006) óleo essencial extraído das suas folhas apresenta rendimento de 0,2%, e demonstra atividade antimicrobiana frente a *Bacillus cereus*, *Stafilococcus aureus* e *Candida albicans*.

Apesar do elevado potencial, poucos são os estudos sobre a domesticação e o cultivo de *M. leucocephalus*, o que viabilizaria sua exploração econômica de forma sustentável. Em trabalho pioneiro, OLIVEIRA et al. (2011) desenvolveram um método de propagação vegetativa dessa espécie a partir de estacas apicais e auxina para indução do enraizamento. Contudo, para o desenvolvimento de sistemas de cultivo outros aspectos devem ser estudados, entre eles os fatores que possam estimular o aumento do teor de compostos voláteis em suas folhas. Neste sentido, tem sido demonstrado que a exposição das plantas aos fatores de estresses abióticos modifica vias metabólicas

secundárias (SELMAR & KLEINWÄCHTER, 2013), com incremento na taxa de síntese de alguns produtos. Entre os fatores abióticos que atuam sobre o metabolismo secundário pode-se citar o acúmulo de metais nas plantas. Conforme MITHÖFER et al. (2004) são muitas as espécies de vegetais que sintetizam e acumulam metabólitos secundários após tratamento com metais. Plantas de *Rosmarinus officinalis* L., expostas ao Cu, apresentaram um aumento nos teores de óleo essencial (DEEF, 2007). Esta tendência também foi verificada em plantas de *Matricaria chamomilla* L. expostas ao mesmo metal (GREJTOVSKY et al., 2006). Adicionalmente, em *Salvia miltiorrhiza* Bunge, cultivadas em solos contendo elevadas concentrações de Cd, foram verificados acúmulo de compostos bioativos hidrossolúveis e lipossolúveis (LI et al., 2013). Apesar da explicação para estes efeitos provocados pelo estresse por metais ainda carecer de maiores estudos (NASIM & DHIR, 2010), estas observações demonstram que estes elementos podem ser úteis como elicitores em plantas que apresentam metabolismo especial.

Por outro lado, a exposição aos metais em níveis elevados também altera o crescimento e o desenvolvimento vegetal, tanto do sistema radicular, como da parte aérea (NAGAJYOTI et al., 2010). Os mesmos autores ainda sugerem que os danos estão associados à redução da capacidade fotossintética e excessiva produção de espécies reativas de oxigênio. Apesar dos efeitos do excesso de metais serem normalmente danosos para os vegetais, a extensão pode variar, dependendo da intensidade do estresse, do tipo de elemento e da espécie de planta estudada (BORGHI et al., 2007).

Com este trabalho, objetivou-se verificar o efeito de doses de Cd, Cu e Zn no crescimento e produção de compostos voláteis de *M. leucocephalus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de crescimento e tratamentos

Estacas apicais de *M. leucocephalus*, com aproximadamente 15 cm de comprimento, foram obtidas da coleção de plantas medicinais e aromáticas da unidade experimental horto florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. Após a coleta, as estacas foram imediatamente transferidas para bandejas plásticas contendo seis litros da solução nutritiva completa de HOAGLAND & ARNON (1950) e mantidas em estufa agrícola (Figura 1 A). O pH da solução foi ajustado em $6,0 \pm 0,2$, sendo monitorado diariamente. Vinte dias após a instalação das plantas no sistema hidropônico, foram iniciados os tratamentos: controle ($0,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metal), $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (15, 30, 45 e $60 \mu\text{mol L}^{-1}$), CuSO_4 (30, 60, 90 e $120 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ZnSO_4 (150, 300, 450 e $600 \mu\text{mol L}^{-1}$). A utilização de diferentes concentrações para cada metal, foi definida em função dos níveis de toxidez de cada elemento determinados em experimentos preliminares, bem como em resultados reportados na literatura para outras espécies (ZHAO et al., 2010; VASSILEV et al., 2011; AMIRMORADI et al., 2012). As soluções nutritivas foram renovadas semanalmente e o volume completado diariamente. O sistema foi mantido sob aeração intermitente (15 minutos a cada três horas) utilizando compressor de ar acoplado a um temporizador. As plantas permaneceram nestas condições durante 15 dias.

Análise do crescimento

As plantas foram coletadas um dia antes e 15 dias após a aplicação dos tratamentos com metais (Figura 1B) e pesadas em balança analítica, para determinação das massas frescas das folhas (MFF), caule (MFC) e raízes (MFR). Em seguida, o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel e transferido para estufa com circulação forçada de ar (60°C) até peso constante, para determinação das massas secas das folhas (MSF), caule (MSC), raízes (MSR) e total (MST). A partir destes dados, foram calculadas a taxa de crescimento relativo (TCR) e a suculência (Suc), de acordo

com metodologia proposta por BENINCASA (2003), utilizando-se as seguintes equações:

$$\text{TCR (g g}^{-1} \text{ d}^{-1}) = (\ln \text{MST}_2 - \ln \text{MST}_1) / (t_2 - t_1)^{-1}$$

$$\text{SUC (g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ MS)} = (\text{MFF}_2 - \text{MSF}_2) / \text{MSF}_2$$

em que: MFF_2 : massa fresca final das folhas; MSF_2 : massa seca final das folhas; \ln : logaritmo neperiano; MST_1 : massa seca total inicial; MST_2 : massa seca total final e $(t_2 - t_1)$ o intervalo de tempo (15 d).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise da variância pelo teste F a 5% de probabilidade, nos casos de significância, realizou-se análise de regressão, utilizando o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003) (Apêndice A).

Quantificação dos compostos voláteis

A extração dos compostos voláteis foi realizada em aparelho de destilação tipo Clevenger. Para cada amostra, foram utilizadas de 1,5 a 3 g de MSF de *M. leucocephalus*. O tempo de destilação foi de 3 h (Figura 1C e 1D). Os compostos voláteis juntamente com a água recolhidos em um funil de separação. Foram adicionados 10 mL de diclorometano por três vezes consecutivas e, em seguida, sulfato de magnésio anidro para separação da água residual. A mistura foi colocada em evaporador rotativo para retirada do diclorometano. O teor dos compostos voláteis foi quantificado por gravimetria em balança analítica e expresso em mg por 100g de MSF.

Preparo dos extratos e determinação das concentrações de metais

Os extratos foram obtidos com a digestão ácida em HNO_3 concentrado e H_2O_2 (30%) utilizando um bloco digestor a 125 °C, durante 60 min, conforme descrito em JONES

(2001). O digerido foi diluído para 50 mL com água desionizada. As determinações de Cd, Cu e Zn foram efetuadas com espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, Varian VISTA-PRO Simultaneous) (Figura 1F).

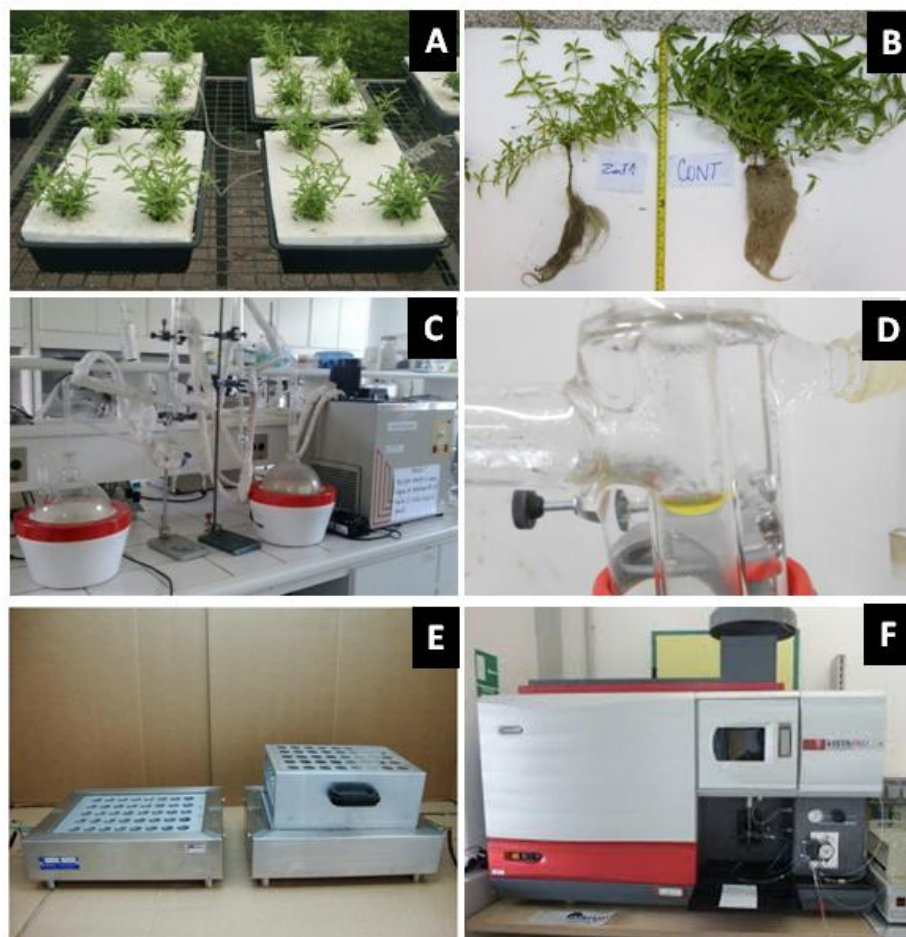


Figura 1. (A) *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivada hidroponia; (B) comparação do crescimento de plantas estressadas e em condições controle (C e D) Clevenger e óleo após 3 horas de destilação; (E) Placas digetoras (F) ICP-OES.

RESULTADOS

Pode-se observar nas Figuras 2 e 3 que o aumento das concentrações de Cd, Cu e Zn na solução nutritiva reduziu todas as variáveis de crescimento, enquanto a adição de Zn aumentou a concentração de compostos voláteis (Figura 4).

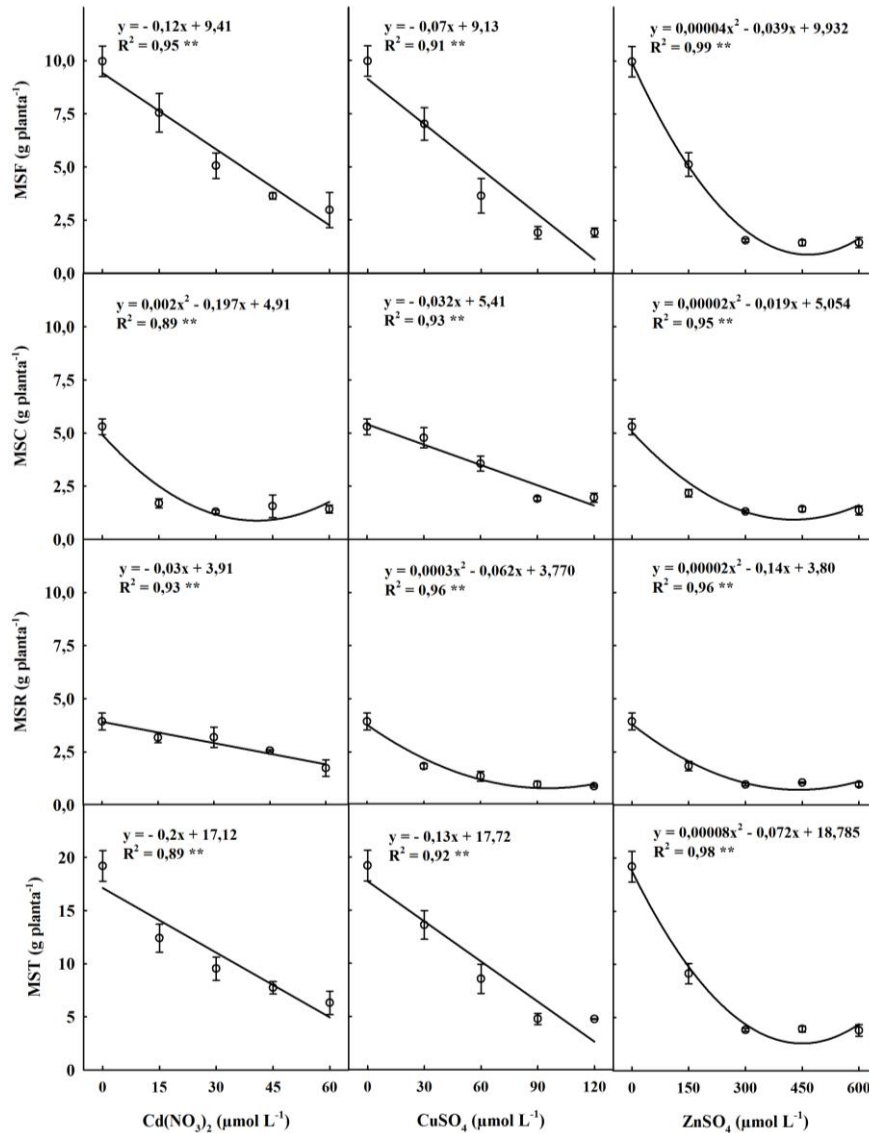


Figura 2. Massa seca de folhas (MSF), caules (MSC), raízes (MSR) e total (MST) de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivadas sob diferentes níveis de Cd, Cu, e Zn em sistema hidropônico. Feira de Santana, 2014.

**Significativo a 1% de probabilidade.

Comparando-se os efeitos das doses dos metais sobre cada parte das plantas, foi evidenciado maior dano nas folhas, onde as doses de Cd, Cu e Zn causaram reduções médias de 70, 81 e 85%, respectivamente (Figura 2). A parte menos afetada pelo Cd foi a raiz, com redução de 56% na maior dose testada deste metal, comparada com os 70 e

73% de reduções verificados nas MSF e MSC, respectivamente. Plantas submetidas à maior intensidade de Cu e Zn, entretanto, apresentaram o caule como a parte menos afetada (63 e 75%).

Com relação a MST, as plantas submetidas às maiores doses de Cd e de Cu tiveram redução de cerca de 75% em relação às plantas controle (Figura 2). Nas plantas expostas ao maior nível de Zn o decréscimo foi maior, da ordem de 85%.

Os resultados mostraram que o incremento dos níveis de Cd, Cu e Zn na solução nutritiva provocou um acúmulo progressivo destes elementos em todas as partes de *M. leucocephalus* (Figura 3). Independentemente do metal e da dose aplicada, as concentrações foram sempre maiores nas raízes que nas demais partes das plantas (Figura 3). Nas plantas sob estresse de Cu e de Zn, os teores desses metais nas folhas e caules foram semelhantes. Entretanto, nas plantas sob estresse de Cd, os teores desse metal nos caules foram cinco vezes maiores que os das folhas.

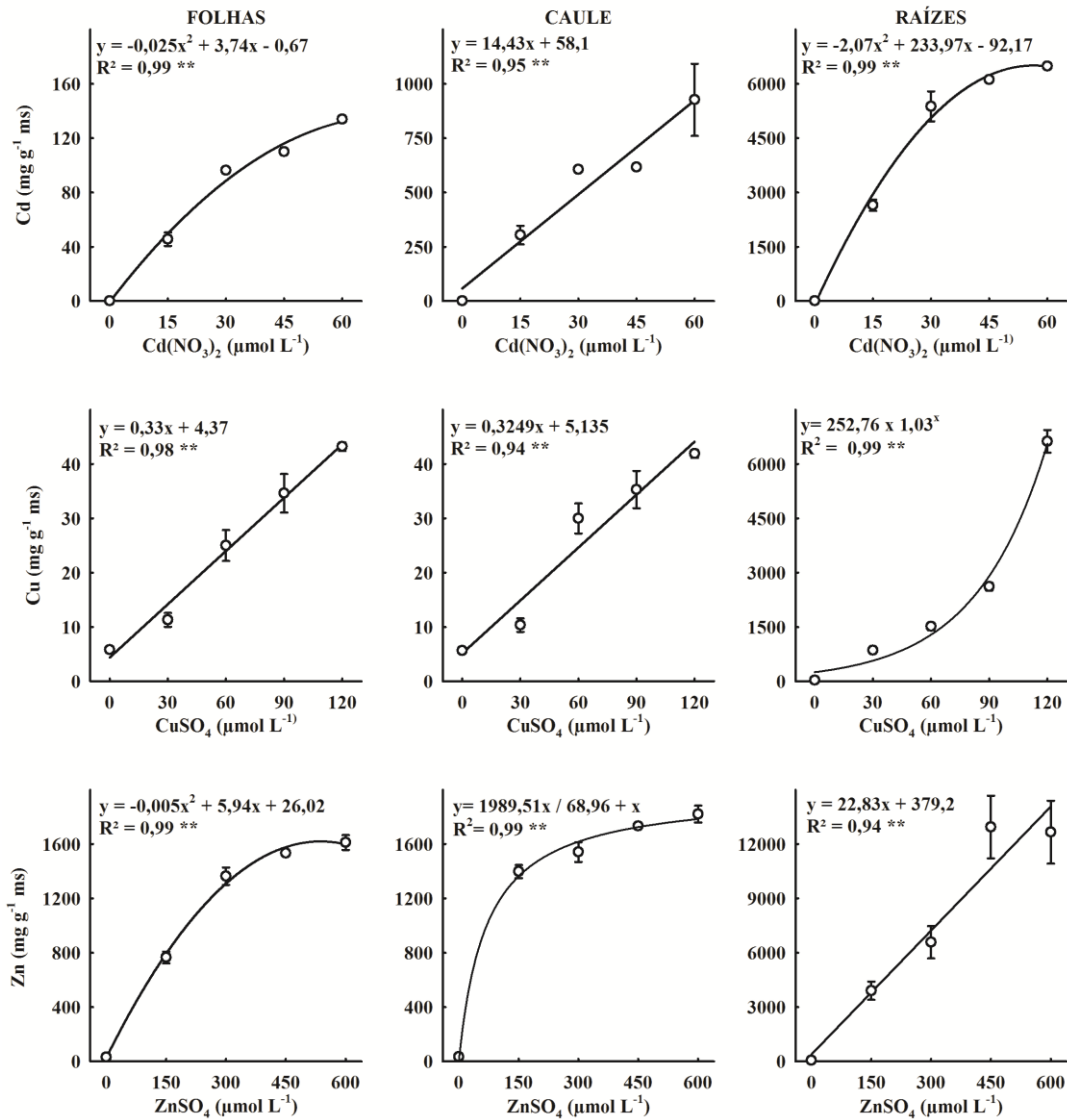


Figura 3. Concentração de metais nas folhas, caules e raízes de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivadas sob diferentes níveis de Cd, Cu, e Zn em sistema hidropônico. Feira de Santana, 2014. **Significativo a 1% de probabilidade.

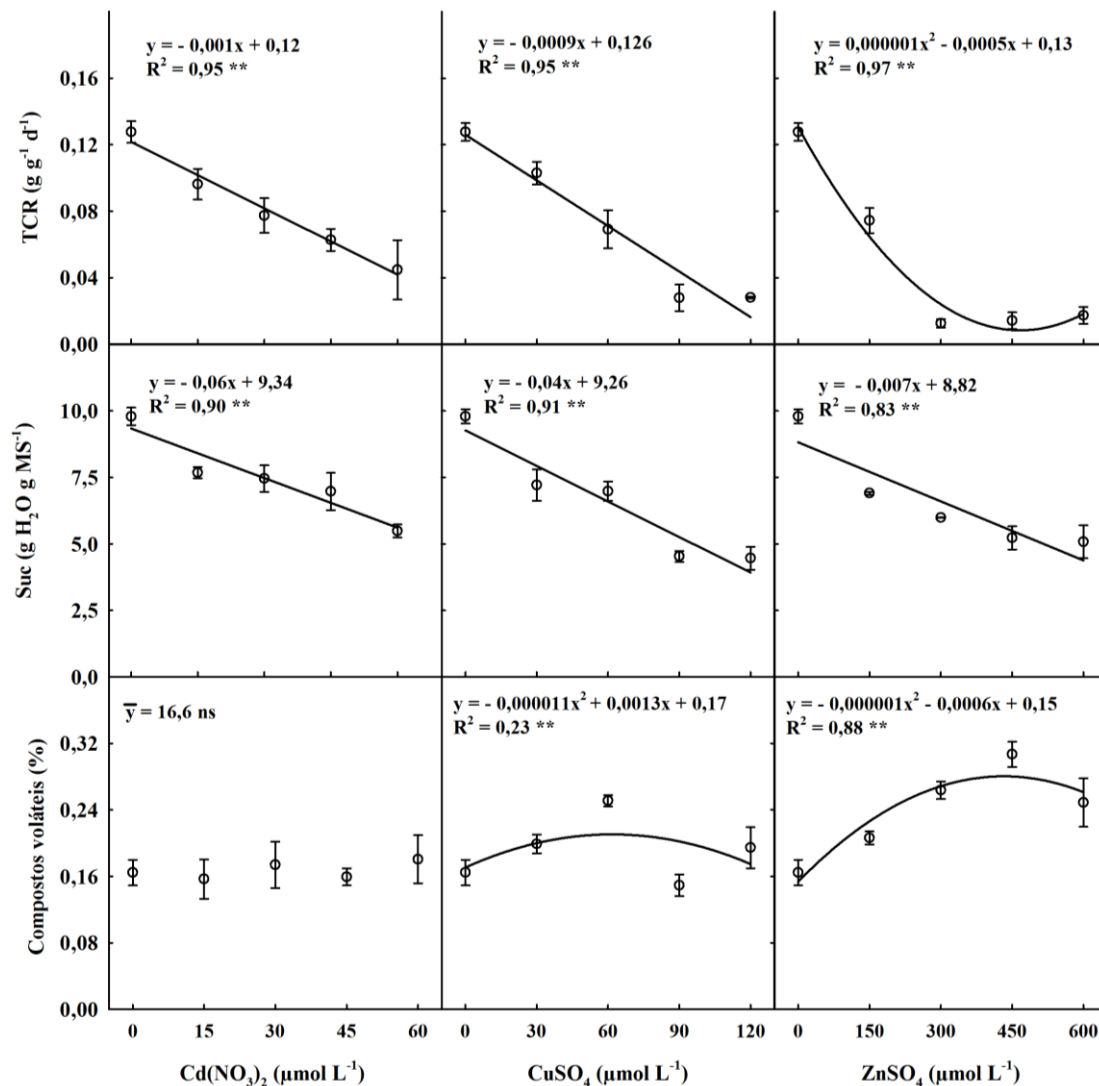


Figura 4. Taxa de crescimento relativo (TCR), suculência (Suc) e rendimento de compostos voláteis de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivadas sob diferentes níveis de Cd, Cu, e Zn em sistema hidropônico. Feira de Santana, 2014. **Significativo a 1% de probabilidade, ns = Diferenças não significativas entre as médias.

Os valores de TCR das plantas expostas às maiores doses de Cd, Cu e Zn apresentaram reduções de 59, 78 e 86%, respectivamente em relação às plantas controle (Figura 4). A suculência foliar dos vegetais expostos às maiores doses de Cd, Cu e Zn caiu aproximadamente à metade do valor verificado nas plantas não estressadas (Figura

4). Entre os metais testados apenas o Zn induziu aumento do rendimento de compostos voláteis em *M. leucocephalus*. Dessa forma, no tratamento de 450 µM deste metal obteve-se um valor médio de 0,31 mg g⁻¹ folha, equivalente a um aumento de 86% em relação ao valor obtido nas plantas controle (Figura 4).

DISCUSSÃO

A avaliação do desempenho das plantas, com base no crescimento, permitiu discriminar a intensidade da toxidez dos elementos aplicados em *M. leucocephalus*. Assim, as reduções da MST induzidas pelo Cu e Cd foram semelhantes, apesar do Cu ter sido aplicado em doses que corresponderam ao dobro do Cd aplicado, o que sugere maior toxidez deste último metal nessa espécie. Por outro lado, a despeito dos efeitos do estresse provocado pelo Zn sobre a MST terem sido relativamente mais severos, a concentração utilizada foi, respectivamente, 10 e 5 vezes maior que a de Cd e a de Cu. Desta forma, os resultados apontam para uma fitotoxicidade crescente entre os elementos Cd > Cu > Zn sobre o crescimento de *M. leucocephalus*.

Considerando que, independentemente do metal aplicado, a MSF foi sempre mais afetada pelo estresse que as demais partes das plantas e que as concentrações de metais tóxicos nas folhas foram sempre inferiores às dos caules e das raízes, os dados sugerem que as folhas de *M. leucocephalus* apresentam uma maior sensibilidade ao acúmulo de metais do que as outras partes da planta.

As raízes acumularam mais metais que as folhas e os caules, indicando uma baixa translocação da raiz para a parte aérea nesta planta (ALI et al., 2012). Além disso, os resultados corroboram o fato de Cu e Zn serem considerados elementos pouco móveis nas plantas (MARSCHNER, 2012). No caso do Cd, a capacidade de transporte interno para este elemento, varia consideravelmente entre as espécies (CHOPRA & PATHAK, 2012). Dessa forma, os resultados desse trabalho indicam uma baixa

mobilidade deste metal em *M. leucocephalus*. Adicionalmente, a restrição da translocação de elementos tóxicos, das raízes para a parte aérea, também tem sido considerada uma condição importante para a tolerância das plantas ao estresse por metais (YANG et al., 2003).

Assim como para a MST, verificou-se declínio da TCR com o incremento das concentrações de todos os metais testados. Essa taxa representa o incremento periódico na MS da planta, em relação a MS preexistente (BENINCASA, 2003). Considerando que os decréscimos de MS mais pronunciados causados pela toxidez desses metais foram nas folhas, os dados sugerem que a toxidez dos metais testados pode reduzir a capacidade fotossintética de *M. leucocephalus*. Distúrbios fotossintéticos são frequentemente verificados em plantas submetidas ao excesso de metais (NAGAJYOTI et al., 2010).

O estresse por metais tem sido descrito como um fator que causa distúrbios hídricos nas plantas (PÁL et al., 2006) efeito também verificado em *M. leucocephalus* e evidenciado através da redução da suculência (Suc). Quando as plantas foram expostas às maiores concentrações de Cd, Cu e Zn verificou-se redução da Suc, em aproximadamente metade dos valores obtidos nas plantas controle. Danos nas relações hídricas de plantas expostas a metais têm sido associados às reduções na permeabilidade das membranas e do diâmetro do feixe vascular, além da inibição da formação de pêlos radiculares (PÁL et al., 2006). Sabe-se que a água é um componente essencial na promoção do crescimento e divisão celulares (JALEEL et al., 2009). Assim, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a redução da Suc nos tecidos de *M. leucocephalus* submetidas aos tratamentos com Cd, Cu e Zn explicam, ao menos em parte, a redução no crescimento desta espécie.

Os resultados mostram que o teor de compostos voláteis foi aumentado pela exposição ao Zn, mas não foi afetado por Cu e Cd (Figura 3). O aumento dos compostos voláteis nas plantas expostas ao Zn sugere um efeito de concentração, haja vista a redução no crescimento das folhas. Alternativamente, o estresse causado por este metal pode ter aumentado a atividade das enzimas isopentenil pirofosfato:dimetilalil pirofosfato isomerase e a fenilalanina amonialiase (LUCINI & BERNARDO, 2015). Estas são enzimas chave na biossíntese de compostos terpênicos e fenilpropânicos, os quais são os principais componentes dos óleos essenciais vegetais (MIGUEL, 2010). Considerando que a redução na produção de massa seca pode ser compensada com o aumento da densidade de plantio, o cultivo de *M. leucocephalus*, com pequenos espaçamentos pode resultar em um aumento real na produtividade de compostos voláteis em solos contaminados com Zn.

Tem sido sugerido que a produção de compostos voláteis em plantas pode representar um importante mecanismo para minimizar os danos causados por estresses abióticos em plantas (TURTOLO et al., 2003). Muitas destas substâncias podem conferir às espécies vegetais proteção contra o estresse oxidativo comum em condições ambientais adversas, como o provocado por excesso de metais (SELMAR & KLEINWÄCHTER, 2013). De acordo com estes autores, mesmo sob circunstâncias altamente negativas e com a fotossíntese severamente afetada, as plantas podem manter a produção de compostos voláteis. Em concordância, os resultados deste trabalho demonstraram que o crescimento foi mais afetado pela presença dos metais do que a concentração dos compostos voláteis, sugerindo que estes compostos desempenham um papel importante no metabolismo de *M. leucocephalus*, mesmo sob condições adversas.

CONCLUSÃO

A concentração de compostos voláteis não foi prejudicada pelo aumento das concentrações dos metais testados em solução. Os resultados também indicam que *M. leucocephalus* pode ser cultivada em ambientes contaminados com Zn, já que nestas condições, apresentam maior concentração de compostos voláteis nos tecidos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALI, H. et al. Phytoremediation of heavy metals by *Trifolium alexandrinum*. International Journal of Environmental Sciences, v.2, p.1459-1469, 2012. Disponível em: <ipublishing.co.in/ijesarticles/twelve/articles/voltwo/EIJES3136.pdf> Acesso em: 15 mar. 2015.
- AMIRMORADI, S. et al. Effect of cadmium and lead on quantitative and essential oil traits of peppermint (*Mentha piperita* L.). Notulae Scientia Biologicae, v.4, p.101-109, 2012. Disponível em: <notulaebiologicae.ro/index.php/nsb/article/view/8185> Acesso em: 10 nov. 2013.
- BENINCASA, M.M.P. Análise de crescimento de plantas: noções básicas. 2ed. Jaboticabal: Funep, 2003, 41p.
- BORGHI, M. et al. Responses of two poplar species (*Populus alba* and *Populus x canadensis*) to high copper concentrations. Environmental and Experimental Botany, v.62, p.290-299, 2008. Disponível em: <article/pii/S0098847207001694> Acesso em: 12 jan. 2014.

CHOPRA, A.K.; PATHAK, C. Bioaccumulation and Translocation Efficiency of Heavy Metals in Vegetables Grown on Long-Term Wastewater Irrigated Soil Near Bindal River, Dehradun. *Agricultural Research*, v.1, p.157-164, 2012. Disponível em: <[10.1007/s40003-012-0016-8](http://dx.doi.org/10.1007/s40003-012-0016-8)> Acesso em: 15 mar. 2015.

DEEF, H.E. Copper treatments and their effects on growth, carbohydrates, minerals and essential oils contents of *Rosmarinus officinalis* L. *World Journal of Agricultural Sciences*, v. 3, n. 3, pp. 322-328, 2007. Disponível em: <[http://www.idosi.org/wjas/wjas3\(3\)/10.pdf](http://www.idosi.org/wjas/wjas3(3)/10.pdf)> Acesso em: 12 jan. 2011.

FALCÃO, D.Q.; MENEZES, F.S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.84, p.68-74, 2003. Disponível em: <http://rbfarma.org.br/files/pag_69a74_vjml00dk.pdf> Acesso em: 12 jan. 2011.

FERREIRA, D.F. SISVAR 4.6 sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2003, 32p.

GREJTOVSKY, A. et al. The response of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) plants to soil zinc supply. *Plant Soil Environmental*, v.52, p.1-7, 2006. Disponível em: <<http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/50510.pdf>> Acesso em: 20 out 2012.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, v.347, p.1-32, 1950.

JALEEL, C.A. et al. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, v.11, p.100-105, 2009. Disponível em: <[fspublishers.org/published_papers/84178..pdf](http://www.fspublishers.org/published_papers/84178..pdf)> Acesso em: 13 fev. 2014.

JONES, J. B. Jr. Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. Boca Raton: CRC Press, 2001. 363 p.

LI, X. et al. Effect of cadmium in the soil on growth, secondary metabolites and metal uptake in *Salvia miltiorrhiza*, *Toxicological & Environmental Chemistry*, v. 95, n. 9, 1525–1538, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02772248.2014.887717>>

Acesso em: 28 out. 2014.

LUCCHESI, A.M. et al. Comparação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de espécies do semi-árido baiano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2006. p.285.

LUCINI, L.; BERNARDO, L. Comparison of proteome response to saline and zinc stress in lettuce. *Frontiers in Plant Science*, v.6, n.240, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00240/abstract>> Acesso em: 06

ago. 2015.

MARSCHNER, P. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3. ed. Londres: Academic Press, 2012. 651 p.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais da família lamiaceae. *Aplicação em Produtos Alimentícios*. *Brazilian Journal of Food*, v. 10, p. 96-103, 2007. Disponível em: <bj.ital.sp.gov.br/artigos/html/busca/PDF/v10n2278p.pdf>

Acesso em: 31 mar. 2013.

MITHÖFER, A. et al. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*, V.566, p.1-5, 2004. Disponível em: <science/article/pii/S0014579304004260> Acesso em: 13 dez. 2013.

MIGUEL, M.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential oil: A short Revision. *Molecules*, v.15, p.9252-9287, 2010. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/15/12/9252>> Acesso em: 13 dez. 2013.

NAGAJYOTI, P.C. et al. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, v.8, p.199-216, 2010. Disponível em: <[article/10.1007%2Fs10311-010-0297-8](http://dx.doi.org/10.1007%2Fs10311-010-0297-8)> Acesso em: 12 jan. 2011.

NASIM, S.A.; DHIR, B. Heavy metal alter the potency of medicinal plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 203, pp. 139-149, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4419-1352-4_5> Acesso em: 28 out. 2012.

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, p.73-78, 2011. Disponível em: <scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000100011> Acesso em: 13 dez. 2013.

PÁL, M. et al. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v.169, p.239-246, 2006. Disponível em: <onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jpln.200520573/abstract> Acesso em: 07 jan. 2014.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, 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, p.817-826, 2013. Disponível em: <pcp.oxfordjournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=23612932> Acesso em: 07 jan. 2014.

TURTOLA, S. et al. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, v.29, p.1981-1995. 2003. Disponível em: <[10.1023%2FA%3A1025674116183](http://dx.doi.org/10.1023%2FA%3A1025674116183)> Acesso em: 28 out. 2012.

VASSILEV, A. et al. Effects of excess Zn on growth and photosynthetic performance of young bean plants. *Journal of Phytology*, v.3, p.58-62, 2011. Disponível em: <[article/10.1023%2FA%3A1025674116183](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653503004995)> Acesso em: 12 fev. 2013.

YANG, B. et al Growth and Metal Accumulation in Vetiver and two *Sesbania* Species on Lead/Zinc Mine Tailings. *Chemosphere*, v.52, p. 1593-1600 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653503004995>> Acesso em: 12 out. 2013.

ZHAO, S. et al. Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in turfgrass. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, v.52, p.7-11, 2010. Disponível em: <www2.ib.uj.edu.pl/abc/pdf/52_2/01_zhao.pdf> Acesso em: 07 jan. 2014.

CAPÍTULO 2

Bioacumulação de Cd, Cu e Zn, nutrientes minerais e produção compostos voláteis em *Martianthus leucocephalus* (mart. Ex benth.) J.F.B. pastore submetida a estresse com metais traços

Bioacumulação de Cd, Cu e Zn, nutrientes minerais e produção compostos voláteis em *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B. pastore submetida a estresse com metais traços

Resumo

Martianthus leucocephalus (Mart. Ex Benth.) J.F.B. Pastore pertence à família Lamiaceae e tem sido citada como uma espécie de elevado potencial fitoquímico e econômico, em virtude da produção de óleos essenciais com atividade antimicrobiana. Contudo, o desenvolvimento de cultivos economicamente viáveis passa pelo desenvolvimento de sistemas de cultivo que possibilitem um maior controle das condições ambientais e/ou estimulação das plantas, buscando-se elevar a produtividade dos compostos bioativos, normalmente em percentuais muito baixos nos tecidos. As plantas respondem a diversos tipos de estresse bióticos e abióticos, entre eles à presença de metais, de diversas maneiras, podendo inclusive elevar a produção de metabólitos secundários. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento, a produção e a composição de voláteis bem como a acumulação de minerais e metais traço em *M. leucocephalus* cultivada sob estresse de Cd, Cu e Zn. Estacas apicais foram transferidas para bandejas plásticas contendo 6 L de solução nutritiva, onde permaneceram até o enraizamento, sendo, então, submetidas doses de Cd, Cu e Zn durante 30 dias. Após esse período as plantas foram colhidas, separando-se as folhas, caules e raízes para quantificação da massa seca, teor e composição dos voláteis, além da acumulação de macro, micronutrientes e metais traço. Foi constatado que formiato de isobornila é o composto majoritário do óleo essencial dessa espécie e que o estresse por metais não afetou a composição química dos voláteis da mesma. Todos os metais avaliados provocaram redução no crescimento e desbalanço nutricional em *M. leucocephalus*. Apenas o Cd estimulou maior produção de óleos essenciais. As plantas acumularam Cd, Cu e de Zn, sobretudo nas raízes, demonstrando o potencial da espécie para a fitoestabilização desses metais em ambientes contaminados.

Palavras-chave: Plantas medicinais e aromáticas; Lamiaceae; Fitorremediação; Elicitação.

Abstract

Martianthus leucocephalus (Mart. Ex Benth.) J.F.B. Pastore belonging to the Lamiaceae family and has been cited as a kind of high phytochemical and economical potential, because the production of essential oils with antimicrobial activity. However, the development of economically viable crops through the development of farming systems that allow greater control of environmental conditions and/or stimulation of plants, seeking to raise the productivity of bioactive compounds, usually at very low percentage in the tissues. Plants respond to various kinds of abiotic and biotic stress, including the presence of metals in various ways, and may even increase the production of secondary metabolites. The objective of this study was to evaluate the growth, the production and volatile composition as well as the accumulation of minerals and trace metals in *M. leucocephalus* cultivated under stress of Cd, Cu and Zn. Apical cuttings were transferred to plastic trays containing 6 L of nutrient solution, where they remained until the roots, and then submitted Cd doses, Cu and Zn for 30 days. After this period the plants were harvested, separating the leaves, stems and roots for quantification of dry matter, composition and content of the volatiles, plus the accumulation of macro, micro and trace metals. It was observed that isobornyl formate is the major compound of the essential oil of the species and the stress metal did not affect the chemical composition of the volatile. All evaluated metals caused reduced growth and nutritional unbalance *M. leucocephalus*. Only Cd stimulated increased production of essential oils. The plants accumulated Cd, Cu and Zn, particularly in the roots, demonstrating the potential of the species to phytostabilization these metals in contaminated environments.

Key-words: aromatic and medicinal plants; Lamiaceae; phytoremediation.

INTRODUÇÃO

A espécie *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B. Pastore, anteriormente designada *Hyptis leucocephala* Mart. Ex Benth, é uma planta medicinal endêmica do semiárido brasileiro e pertencente à família Lamiaceae (Harley e Pastore, 2012). Tem sido citada como uma espécie de elevado potencial fitoquímico e econômico, sendo utilizada por comunidades locais para o tratamento de distúrbios respiratórios (Azevedo, 2014). É uma erva aromática decumbente de cerca de 20 cm de

altura, que apresenta folhas cartáceas, flores com cálice esverdeado e corola arroxeadas. As folhas produzem óleos essenciais com rendimentos de 0,1 a 0,3%, composto por uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos, tendo o formiato de isorbonila como composto majoritário (Lucchese et al., 2005). Possui atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (Lucchese et al., 2005), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. schleiferi*, *Salmonella thiphi*, *Escherichia coli*, *Burkholderia* sp. e *Klebsiella pneumoniae*, além de atividade contra alguns fungos fitopatogênicos, como *Sclerotinium rolfis* e *Rhizoctonia solani* (Santos et al., 2011).

A presença de substâncias bioativas em seus óleos essenciais, com ação contra microrganismos multiresistentes a antibióticos existentes no mercado farmacêutico mundial, torna a espécie uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos. Contudo, o baixo rendimento de óleos essenciais nos tecidos representa a maior limitação para a sua exploração comercial. *M. leucocephalus* já vem sendo pesquisada quanto ao desenvolvimento de sistemas de cultivo (Oliveira et al., 2011), sendo necessária, contudo, a busca por técnicas que proporcionem maior produção dos compostos de interesse.

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para melhorar a produtividade de compostos bioativos de interesse nos vegetais, incluindo a seleção de plantas, otimização das condições de cultivo, uso de eliciadores e engenharia metabólica (Chen e Chen, 2000). A utilização de moléculas eliciadoras representa uma abordagem eficiente para o aumento do metabolismo secundário, podendo viabilizar a exploração comercial de muitos compostos de elevado valor agregado (Dörnenburg e Knorr, 1995). Extratos de microrganismos patogênicos, moléculas sinalizadoras dos mecanismos de defesa das plantas, enzimas, radiação ultravioleta, metais pesados e compostos químicos têm sido citados como agentes eliciadores em plantas (Pitta-Alvarez et al., 2000).

Muitas plantas sintetizam e acumulam os metabólitos secundários após tratamento com os metais (Mithöfer et al. 2004). Em *Mentha arvensis* (Misra, 1992), *Matricaria chamomilla* (Grejtovský et al., 2006) e *Rosmarinus officinalis* L. (Deef, 2007) foram verificados aumentos nos teores de óleo essencial quando cultivadas na presença de metais. Entretanto, os efeitos desses metais podem ser contrastantes, dependendo, dentre outros fatores, do tipo de espécie estudada (Nasim e Dhir, 2010). Por outro lado, considera-se que a biodisponibilidade de metais representa um risco potencial para as plantas. Este tipo de estresse causa diversas alterações fisiológicas, as quais prejudicam o crescimento e o desenvolvimento do vegetal (Gill, 2014; Ovečka e

Takáč, 2014). Apesar dos danos serem generalizados, a raiz é o sítio primário de contato e muitos sintomas podem estar associados às limitações na capacidade de absorção de água e nutrientes minerais.

Adicionalmente, sabe-se que elevadas concentrações ambientais de metais têm efeitos adversos para toda a biota, pois estes elementos interferem no funcionamento normal de sistemas vivos. Assim, a extração dos metais dos solos é extremamente necessária a fim de minimizar o seu impacto sobre os ecossistemas (Ali et al., 2013). Algumas espécies vegetais apresentam capacidade de extrair e concentrar grandes quantidades de metais nos tecidos. Com o auxílio destes organismos os elementos podem ser removidos de locais poluídos, sendo o mecanismo denominado fitorremediação (Hameed et al., 2012). Tal processo tem sido bastante investigado por ser considerado eficiente e de baixo custo quando comparado aos meios usuais de remediação (Vamerali et al., 2010). Neste sentido, muitos representantes da família Lamiaceae figuram entre as plantas potencialmente reconhecidas como fitorremediadoras (Prasad e Freitas, 2003; Zheljzkov et al., 2008; Seyedsadr et al., 2013).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do Cd, Cu e Zn sobre o crescimento, produção e composição dos compostos voláteis, bem como a acumulação de minerais e metais nos tecidos de *M. leucocephalus* cultivado em sistema hidropônico.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo

O experimento foi realizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), 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. Estacas apicais de *M. leucocephalus* com aproximadamente 15 cm de comprimento foram obtidas de plantas matrizes mantidas na Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas da UEFS e identificadas no Herbário desta mesma instituição (HUEFS) (Voucher 25.322).

Após a coleta as estacas foram imediatamente transferidas para bandejas plásticas contendo seis litros da solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1950)

e mantidas em estufa agrícola. O pH da solução foi ajustado em $6,0 \pm 0,2$, sendo monitorado diariamente (Figura 1A e 1B). Vinte dias após a instalação das plantas no sistema hidropônico (fase de enraizamento) foram iniciados os tratamentos: controle ($0,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metal), $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ($7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), CuSO_4 ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ZnSO_4 ($75 \mu\text{mol L}^{-1}$). As concentrações utilizadas foram definidas com base nos resultados obtidos em testes previamente realizados para identificação das concentrações limites, que provocavam sinais morfológicos visíveis de estresse, sem, contudo, levar às plantas a morte. As soluções nutritivas foram renovadas semanalmente e o volume completado diariamente. O sistema foi mantido sob aeração intermitente (15 minutos a cada três horas) por meio de compressor de ar acoplado a um temporizador. As plantas permaneceram nestas condições durante 30 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma bandeja contendo quatro plantas (Figura 1A). Os resultados foram submetidos à análise da variância pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro utilizando o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2003).

Quantificação do crescimento, teor e composição de compostos voláteis

As plantas foram coletadas 30 dias após o início da aplicação dos tratamentos com metais, sendo separadas em folhas, caules e raízes. O material vegetal foi acondicionado em sacos de papel e transferido para estufa com circulação forçada de ar (60°C) até peso constante, para determinação das massas secas da parte aérea (MSPA), raízes (MSR) e total (MST), com auxílio de balança de precisão.

A extração dos óleos essenciais foi realizada em aparelho de destilação tipo Clevenger. Para cada repetição foram utilizadas de 12 a 15 g de massa seca de folhas. O tempo de destilação foi de 3 h (Figura 1C) e, após esse período, o óleo essencial juntamente com a água foi recolhido em um funil de separação, adicionando-se 10 mL de diclorometano (três vezes) e, em seguida, sulfato de magnésio anidro, para separação da água residual. Finalmente, o filtrado foi colocado em evaporador rotativo para retirada do diclorometano. O teor do óleo essencial foi quantificado pela massa de óleo, medido em balança analítica, e expresso em massa/massa (mg de óleo por 100g de matéria seca da folha).

A análise dos compostos voláteis foi efetuada no Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos da UEFS (LAPRON), através da combinação de técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada a um Detector de Ionização em Chama (CG/DIC), para quantificação dos constituintes e determinação do índice de Kovats² e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) para identificação dos constituintes. Nas análises por CG/DIC 25 mg do óleo essencial foram previamente diluídos em 0,5 mL de metanol utilizando um Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 equipado com injetor automático AOC-20i, coluna capilar Rtx-5 (30 m x 0,25 mm), espessura do filme 0,25 µm, temperatura do injetor 220°C e do detector 240°C, hélio como gás de arraste (1,2 mL min⁻¹), com programa de temperatura do forno de 60° a 240°C a 3°C min⁻¹, mantendo a 240°C por 20 min, split de 1:20, volume de injeção de 1 µL. As análises por CG/EM foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu®, com injetor automático AOC-20i, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm), espessura do filme 0,25 µm, temperatura do injetor 220°C, gás de arraste hélio (1 mL min⁻¹), temperatura da interface e da fonte de ionização 240°C, energia de ionização 70, corrente de ionização 0,7 kV e programa de temperatura e split semelhante à descrita acima (Figura 1 D e E).

A identificação dos constituintes foi realizada através do cálculo do índice de Kovats¹ de cada um dos picos. Os índices foram calculados com a utilização de cromatogramas obtidos pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcanos (C8 a C24). Cada pico do cromatograma foi também identificado pelo seu espectro de massas, pela comparação com a biblioteca do equipamento, consulta a literatura especializada (Adams, 2007; Joulain e Konig, 1998) e injeção de padrões. Já a quantificação do percentual relativo dos constituintes identificados foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes pelo método da normalização.

Quantificação dos minerais e dos metais Cd, Cu e Zn

As amostras de folha, caule e raiz foram preparadas através da digestão ácida em HNO₃ (conc.) e H₂O₂ (30%). Inicialmente uma pré-digestão foi realizada, colocando

² O índice de Kovats é um índice de retenção que descreve o comportamento de retenção do composto comparativamente ao de uma mistura de alcanos de diferentes números de átomos de carbono. Este índice de retenção fornece informação sobre a sequência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura, sendo independente das condições experimentais (Janzantti et al., 2003).

aproximadamente 0,5 g de cada amostra triturada em contato com 5 ml de HNO_3 por uma noite (12 h). Após a pré digestão, as amostras foram colocadas em um bloco digestor a 125 °C por 1 h e, em seguida, foram adicionados 3 ml de H_2O_2 , sendo novamente dispostas no bloco digestor, desta vez, por 30 min. Este último procedimento foi repetido até a amostra ficar totalmente clara. O extrato resultante foi diluído para 50 ml com água deionizada. As determinações de cálcio (Ca), enxofre (S), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K), ferro (Fe), manganês (Mn) e dos metais traços utilizados como tratamento (Cd, Cu e Zn) foram realizadas por espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) (Varian Vista PRO) (Figura 1 F).

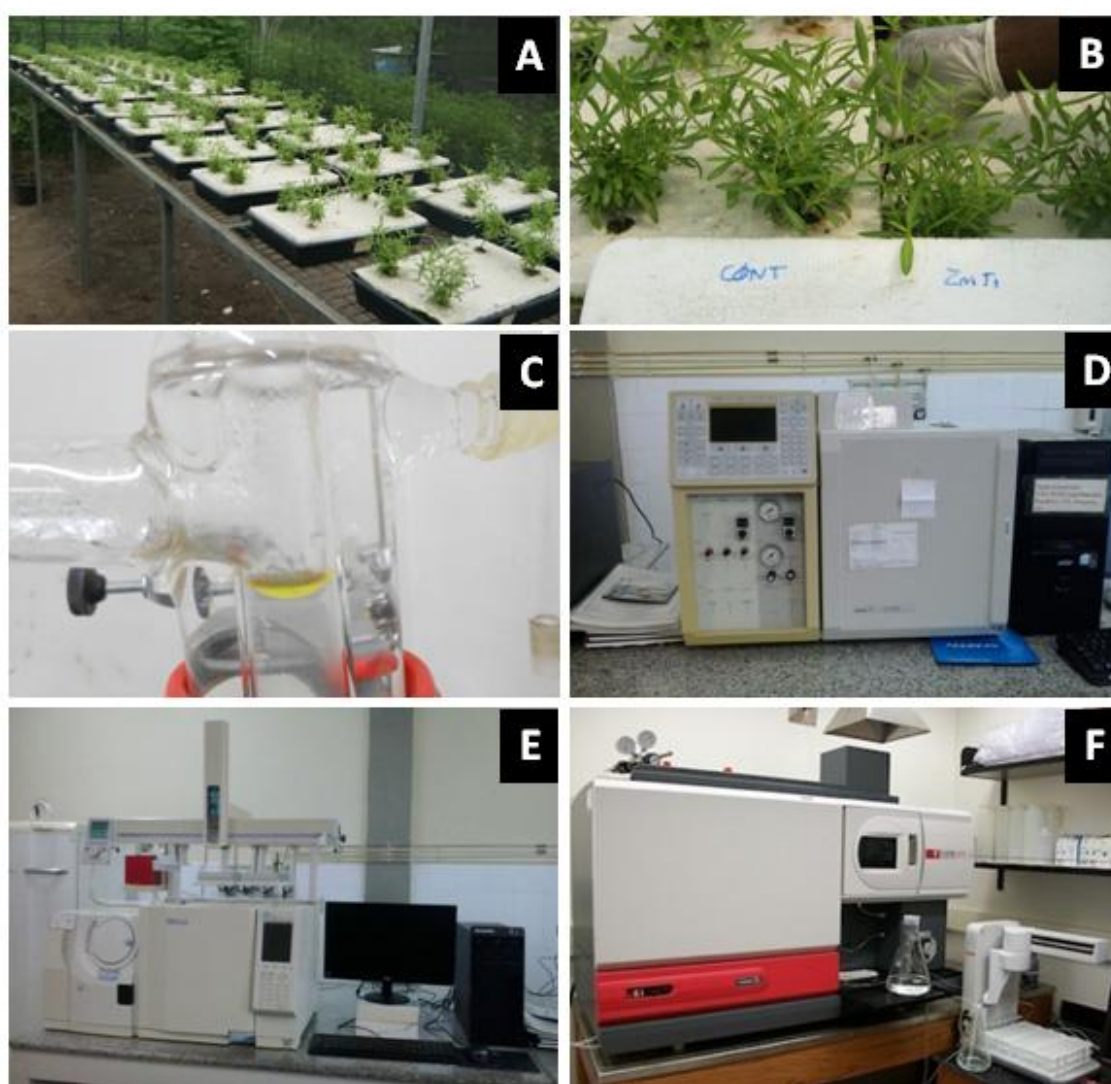


Figura 1. (A) *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivada hidroponia; (B) crescimento de plantas estressadas e em condições controle; (C) óleo após 3 horas de destilação; (D) CG/DIC; (E) CG/EM (F) ICP-OES.

Bioacumulação e translocação dos metais

Os fatores de bioacumulação na parte aérea (FB) e nas raízes (FB'), bem como o fator de translocação (FT) foram calculados conforme sugerido por Ali et al. (2012), utilizando as seguintes razões: $FB = C_{PA}/C_S$; $FB' = C_R/C_S$ e $FT = C_{PA}/C_R$.

Onde: C_{PA} – é a concentração do metal na parte aérea; C_R – é a concentração do metal nas raízes; e C_S – é a concentração do metal aplicado na solução nutritiva.

RESULTADOS

Crescimento, teor e composição dos compostos voláteis

A análise de variância demonstrou que os tratamentos com metais provocaram efeito significativo no crescimento e no teor de compostos voláteis das plantas de *M. leucocephalus* (Apêndice B IV). Os resultados demonstraram que as plantas expostas aos elementos Cd, Cu e Zn apresentaram uma redução significativa na produção de massa seca (Figura 2) quando comparado ao tratamento controle, não havendo diferenças estatísticas entre os efeitos desses metais sobre a MSPA e MST. Comparando o efeito do estresse imposto por cada tipo de metal verificou-se que o Cd promoveu maior redução sobre a MSPA (23%) do que na MSR (12%) (Figura 2). De maneira contrária, nas plantas submetidas ao tratamento com Cu a MSR foi mais afetada (28%) em comparação com a MSPA (21%) (Figura 2). Já nas plantas expostas ao Zn, os danos no crescimento em ambas as partes foram semelhantes estatisticamente (21%) (Figura 2). Para o teor de óleos essenciais a análise dos dados demonstrou que apenas o Cd promoveu efeitos significativos, promovendo incremento de 32% na produção dos compostos voláteis em relação às plantas controle (Figura 2).

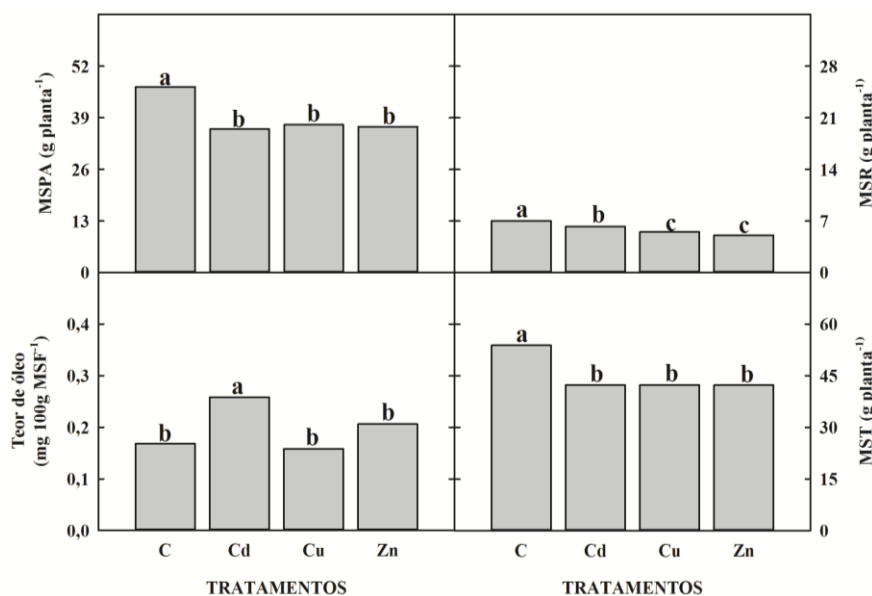


Figura 2 - Massa seca da parte aérea (MSPA), raízes (MSR), total (MST) e teor de óleo de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle (C) e submetidas a estresse por Cd (7,5 mmol L⁻¹), Cu (15 mmol L⁻¹) e Zn (75 mmol L⁻¹) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si conforme o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A análise da composição química dos compostos voláteis nas folhas de *M. leucocephalus* demonstrou um predomínio de sesquiterpenos, os quais totalizaram cerca de 40% dos compostos identificados (Tabela 1). Dentro desta classe destaca-se a presença do óxido de cariofileno (10,4%), E-cariofileno (8,8%) e α muurolool (8%). Por outro lado, os resultados demonstraram que o monoterpene monoxigenado formiato de isobornila apresentou a maior concentração, representando cerca de 20% do total de moléculas identificadas. Os resultados apontam ainda que o estresse provocado pelos metais não alterou significativamente a composição química e a concentração das substâncias voláteis nas folhas de *M. leucocephalus* (Tabela 1) (Apêndice B I). O resultado completo da composição química do óleo essencial pode ser visualizado nos Apêndices D, E, F e G.

Tabela 1. Principais constituintes químicos do óleo essencial de *Marthianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle (C) e submetidas a estresse por Cd (7,5 mmol L⁻¹), Cu (15 mmol L⁻¹) e Zn (75 mmol L⁻¹) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si conforme o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Composto	IK _{lit}	IK _{cal}	Controle %	Cu %	Cd %	Zn %	CV
	c						
Formiato de isobornila (M)	1239	1229	20a	18,1a	17,8a	19,2a	16,11
E-cariofileno (S)	1419	1422	8,8a	10,3 a	11,3a	11a	27,43
Germacreno D (S)	1485	1482	3a	3,8a	4,2a	3,7a	32,97
Viridifloreno (S)	1496	1497	5,2a	6,4a	7a	5,9a	36,59
Espatuleno (S)	1578	1579	5,1a	4,5a	4,3a	5a	21,66
Óxido de cariofileno (S)	1583	1584	10,4a	9,2a	6,4a	8,3a	42,23
α-muurolo (S)	1646	1642	8a	8,5a	8,7a	8,7a	13,02
Monoterpenos (M)			20	18,1	17,8	19,2	
Sesquiterpenos (S)			40,5	42,7	41,9	42,6	
Total identificado			60,5	60,8	59,7	61,8	

*KI_{lit}= índice de Kovats da literatura; IK_{calc} = índice de Kovats calculado.

Teores dos minerais e de Cd, Cu e Zn

O estresse provocado pela presença de Cd, Cu e Zn na solução nutritiva alterou os níveis de K, P e S nos órgãos das plantas (Figura 3) (Apêndice B II). Os níveis de K nas raízes aumentaram 71%, 54% e 49% nas plantas submetidas ao Cd, Cu e Zn, respectivamente. Por outro lado, verificou-se aumentos de 54%, 35% e 48% na concentração de S na parte aérea das plantas expostas aos tratamentos de Cd, Cu e Zn, respectivamente, não afetando significativamente sua concentração nas raízes. Já em relação ao P, verificou-se aumentos em níveis superiores a 50% em ambas as partes das plantas (Figura 3).

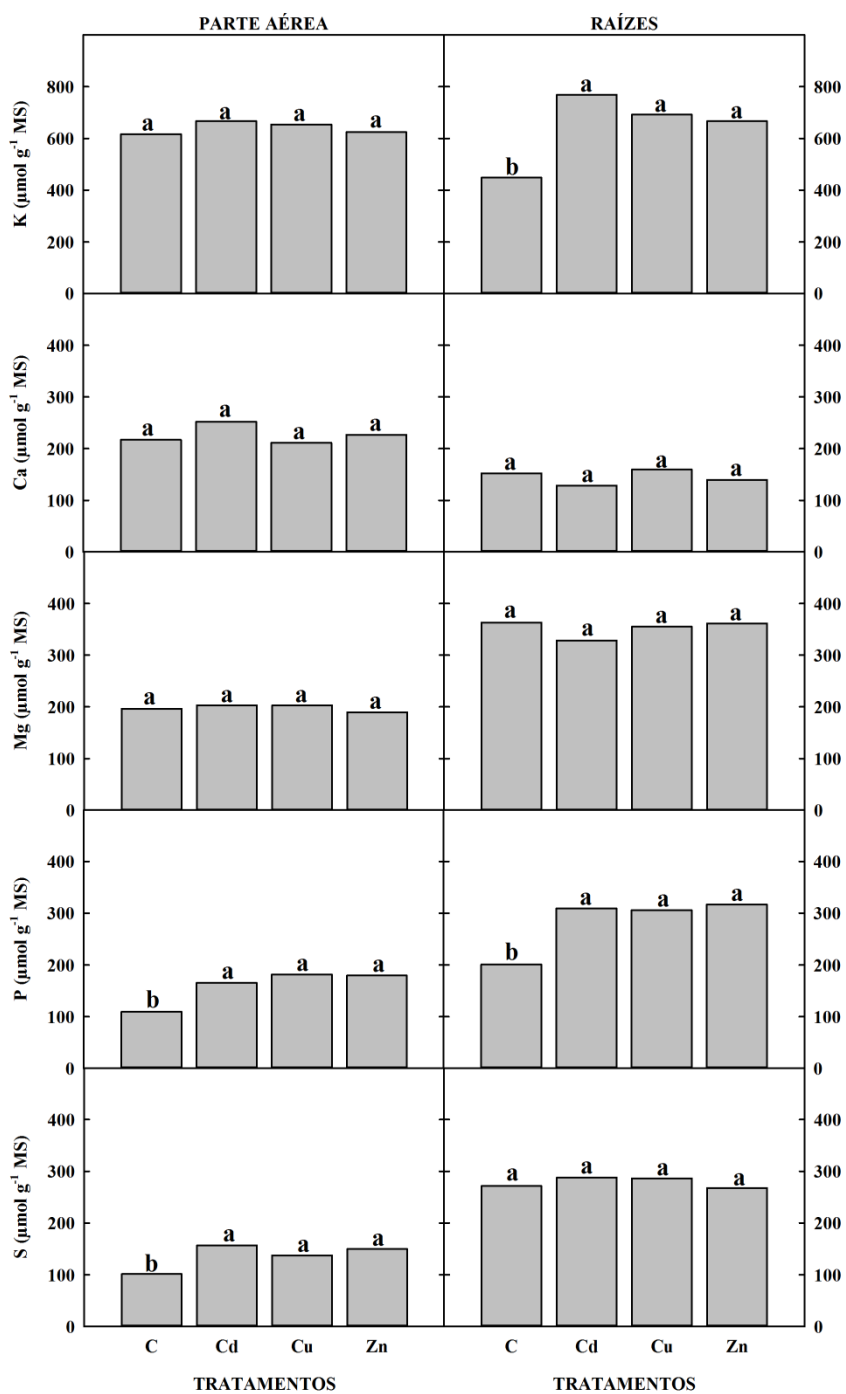


Figura 3 - Concentrações de enxofre (S), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K) e cálcio (Ca) na parte aérea e raízes de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle (C) e submetida a estresse por Cd ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cu (15 mmol L^{-1}) e Zn (75 mmol L^{-1}) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si conforme o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Na parte aérea das plantas submetidas a estresse por Cd foram verificados incrementos nos níveis de Mn (26%), enquanto que nas plantas cultivadas na presença de Zn foram detectados aumentos nos níveis de Cu (13%) e Fe (20%) (Figura 4). Já nas raízes, verificou-se aumento nos níveis de Fe em plantas submetidas à presença de Cu e Zn e de Mn em plantas cultivadas na presença de Cu (Figura 4). Os resultados demonstraram ainda que nas plantas tratadas com metais, os níveis de Cd, Cu e Zn foram significativamente maiores do que aqueles encontrados nas plantas submetidas ao tratamento controle, sem a adição dos metais, com aumentos de 27, 1,6 e 5,3 vezes na parte aérea e 196, 4 e 12 vezes nas raízes (Figura 4) (Apêndice B III).

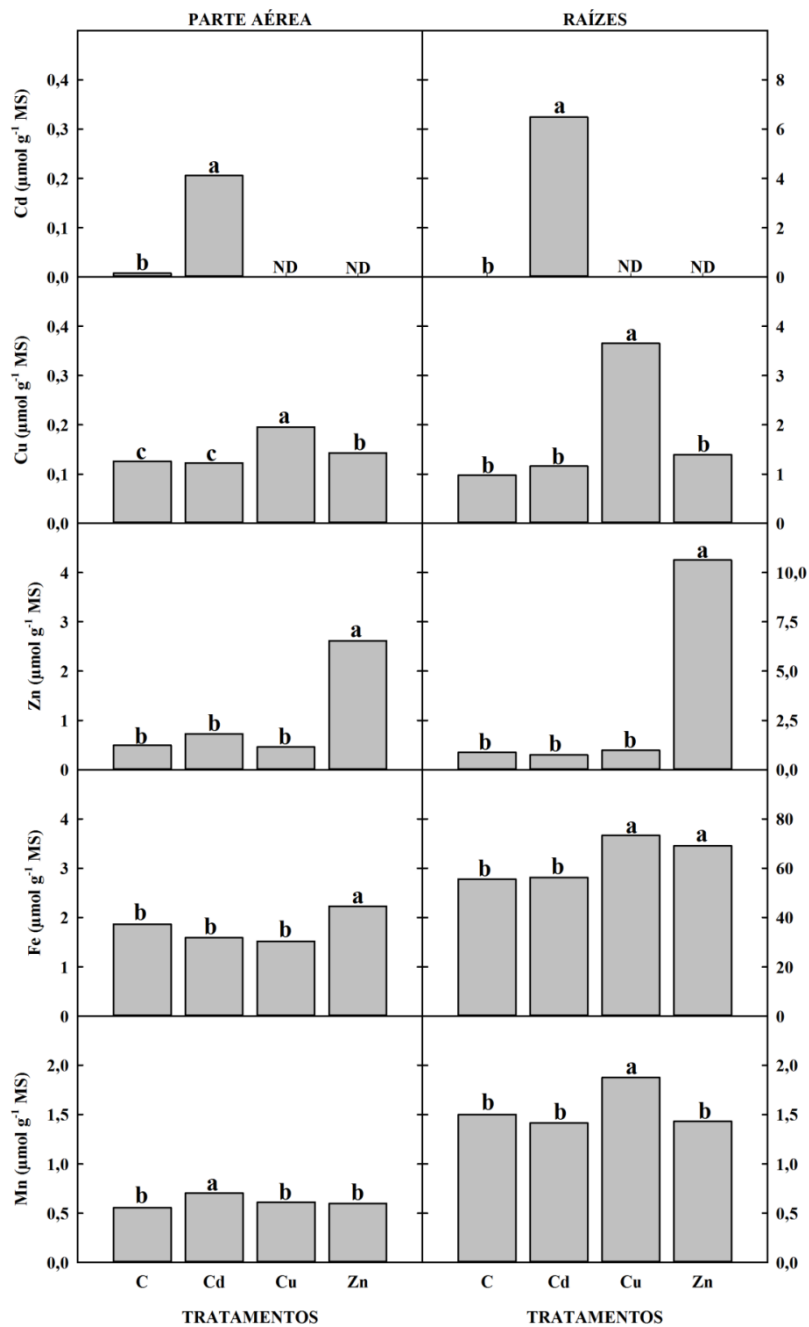


Figura 4 - Concentrações de cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn) e de cádmio (Cd) na parte aérea e raízes de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle (C) e submetidas a estresse por Cd ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cu (15 mmol L^{-1}) e Zn (75 mmol L^{-1}) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si conforme o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Bioacumulação e translocação dos metais

Os resultados demonstraram que os fatores de bioacumulação nas raízes (FB') foram 31 (Cd), 18 (Cu) e 3,1 (Zn) vezes maiores do que aqueles verificados na parte aérea (FB) (Tabela 2). Para todos os metais testados os fatores de translocação calculados ficaram abaixo de 1 (Tabela 2).

Tabela 2 - Fator de bioacumulação nas folhas (FB) e nas raízes (FB') e fator de translocação (FT) de cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) obtidos para plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetidas a estresse por Cd (7,5 mmol L⁻¹), Cu (15 mmol L⁻¹) e Zn (75 mmol L⁻¹) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014.

Metal aplicado	FB	FB'	FT
Cd	27,39 ± 3,40	864,58 ± 117,28	0,032 ± 0,004
Cu	13,025 ± 0,69	243,44 ± 31,95	0,054 ± 0,009
Zn	34,87 ± 4,99	141,92 ± 12,55	0,248 ± 0,049

DISCUSSÃO

Dentre os diversos estresses abióticos aquele causado por metais traços é considerado um dos mais importantes, afetando seriamente o metabolismo e o crescimento vegetal. A intensidade dos danos causados por este tipo de estresse é influenciado pelo tipo de metal envolvido. Elementos como o Cu e Zn, que são requeridos em processos metabólicos, normalmente apresentam caráter fitotóxico quando disponibilizados em altas concentrações. Por outro lado, o Cd, elemento não essencial, pode ser danoso ainda que em baixa quantidade no ambiente. Consoante com estas observações, independentemente do tipo de metal adicionado na solução nutritiva, as plantas de *M. leucocephalus* apresentaram menores acúmulos de massa seca do que aquelas cultivadas em condições controle. Comparativamente, os resultados demonstraram que os prejuízos no crescimento das plantas provocados pelos tratamentos com metais foram semelhantes. Entretanto, considerando que o Cd esteve disponível em menor concentração, este elemento pode ser considerado mais fitotóxico

para *M. leucocephalus*. A toxidez dos metais afetou a produção de massa seca tanto da raiz como da parte aérea. Como este efeito foi acompanhado de aumento da concentração de Cd, Cu e Zn em ambas as partes das plantas, pode-se inferir que o acúmulo destes metais nos tecidos das plantas explique, ao menos em parte, os danos no crescimento desta espécie.

A exposição de *M. leucocephalus* ao estresse por Cd provocou um incremento de aproximadamente 30% no teor de compostos voláteis nas folhas. Este resultado corrobora com a hipótese de que o Cd promove o acúmulo de metabolitos secundários em plantas (Li et al., 2012; Li et al., 2013). Alguns destes compostos podem ser considerados importantes componentes de defesa contra o estresse de Cd, provavelmente atuando como parte do sistema de defesa antioxidante (Li et al., 2012). Considerando que apenas a exposição ao Cd provocou aumento no teor de compostos voláteis de *M. leucocephalus* é provável que seu acúmulo seja importante para o crescimento desta espécie em ambientes contaminados com o metal. Conforme Wilhelm e Selmar (2011), sob condições adversas, o fluxo principal de carbono da fotossíntese não é direcionado ao crescimento, mas sim para a produção de substâncias associadas à tolerância ao estresse. Ainda segundo os autores este mecanismo pode resultar no reestabelecimento da homeostase do metabolismo das plantas.

Muitas pesquisas têm demonstrado que plantas aromáticas expostas a diversos tipos de estresse apresentam alteração na qualidade do óleo essencial. Neste sentido, foi encontrada uma diminuição nos níveis de α - e β -tujonas e aumento nos níveis de cânfora em plantas de *Salvia officinalis*, crescendo em solos contaminados com metais (Stancheva et al., 2009). Após uma infecção viral, o perfil de monoterpenos se manteve inalterado em *Echinacea purpúrea*, porém a quantidade de mirceno e alfa-pineno foi superior (Hudaib et al., 2002). Em *Ocimum selloi*, a exposição à luz ultravioleta provocou um aumento na síntese sesquiterpenos (Costa et al., 2010), enquanto que em *Nigella sativa*, o estresse hídrico resultou no incremento da produção de carvacrol e diminuição de outros monoterpenos (Mozaffari, et al., 2000).

Tais variações na composição do óleo de plantas expostas aos estresses bióticos e abióticos são frequentemente mediadas pelo aumento da atividade transcricional de genes específicos. Além disso, a imposição de estresses afeta a atividade de enzimas por meio de alterações pós transcricionais (Singh e Sharma, 2015). Por exemplo, a atividade da enzima 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase (HMGR), reguladora da via do ácido mevalônico, é controlada de forma pós-transcricional através da fosfatase A2 e

por ubiquitinas ligases (Singh e Sharma, 2015) as quais, respectivamente, modulam a desfosforilação e a degradação desta enzima. Desta maneira, as variações específicas na síntese de isoprenóides dependem da espécie vegetal, do tipo e intensidade do estresse e são dinamicamente reguladas em diferentes níveis metabólicos (Kumari et al., 2014).

Considerando que o estresse por metais não afetou a composição química dos compostos voláteis de *M. leucocephalus* (Tabela 1), os resultados deste trabalho sugerem que, nesta espécie, os estresses por Cd, Cu e Zn não provocaram alterações no fluxo metabólico associado à biossíntese destes compostos. Do ponto de vista do cultivo de *M. leucocephalus* em solos contaminados com metais pesados, esta manutenção na qualidade do óleo pode ser um resultado interessante, haja vista o efeito elicitor do Cd sobre o teor de óleo nessa espécie.

Distúrbios nutricionais estão entre os principais mecanismos pelos quais os metais exercem efeitos tóxicos nas plantas (DalCorso et al., 2010). Nestas condições, a arquitetura da raiz pode ser prejudicada, ocorrendo reduções na permeabilidade das membranas e no diâmetro do feixe vascular, ocorrendo ainda, a inibição da formação de pêlos radiculares (Pál et al., 2006). Além disso, devido à similaridade entre a forma iônica dos metais e alguns nutrientes pode ocorrer uma competição entre estes pelo transporte através da membrana das células das raízes (DalCorso et al., 2010). Contudo, os resultados verificados neste trabalho contrastam com estas observações, pois os tratamentos com metais não prejudicaram a absorção ou a translocação de nenhum dos minerais pesquisados nos tecidos de *M. leucocephalus*, demonstrando que generalizações acerca dos efeitos tóxicos dos metais são difíceis, pois são dependentes da espécie estudada, concentração e tipo de metal e duração do estresse (Bertrand e Guary, 2001). Assim, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os danos causados pelo estresse de Cd, Cu e Zn ao crescimento de *M. leucocephalus* provavelmente não estão associados a danos nas concentrações de nutrientes minerais.

Por outro lado, o excesso de metais na solução nutritiva provocou incremento nos teores de alguns dos elementos investigados, como S nas folhas, K nas raízes e P em ambas as partes das plantas submetidas ao estresse. Tem sido sugerido que o S e o P desempenham papel importante na desintoxicação de metais em plantas vasculares. O S é fundamental para a síntese de polipeptídeos com função quelante (fitoquelatinas e metalothioneínas), enquanto o P pode complexar metais nos tecidos de forma direta (Nocito et al., 2007; Andrade e Silveira, 2008; Jesus e Azevedo Neto, 2013). Dessa forma, considerando que o aumento da concentração do P e do S e também dos metais

ocorreu em todos os tratamentos, é provável que tenha ocorrido a formação de complexos entre estes elementos, reduzindo a disponibilidade de S e P para as atividades metabólicas e, conseqüentemente, reduzindo o acúmulo de biomassa nos tecidos. Os resultados encontrados para os níveis de K podem estar associados ao fato deste elemento ser um cátion monovalente (K^+) e, desta forma, sua absorção pode ter sido pouco afetado pelo excesso dos cátions divalentes (Cd^{++} , Cu^{++} e Zn^{++}). Adicionalmente, plantas submetidas ao excesso de metais podem aumentar a absorção de elementos e evitar um possível risco de deficiência nas folhas (van de Mortel et al., 2006). A manutenção das concentrações de K nas folhas das plantas sob estresse pode confirmar esta hipótese (van de Mortel et al., 2006).

Foi verificado que o estresse por Cd provocou incremento na concentração de Mn na parte aérea (Figura 4). Este efeito também foi encontrado para a concentração de Cu em plantas tratadas com o excesso de Zn. Estes resultados podem indicar que, nestas condições, a translocação destes minerais foi aumentada em *M. leucocephalus*. Aumentos nas concentrações de Fe e de Mn nas raízes de plantas estressadas pelo Cu podem ser resultantes de um aumento na absorção destes nutrientes. Conforme Kabata-Pendias (2011), apesar dos efeitos do excesso de cobre sobre a absorção de Fe e Mn nas plantas serem contraditórias, incrementos têm sido verificados.

Muitas plantas podem ser úteis na remoção de metais em ambientes poluídos por meio da fitorremediação (Kabata-Pendias, 2011). Este processo pode ser alcançado através de diferentes estratégias, as quais estão associadas à capacidade da planta em adsorver, absorver, acumular e distribuir estes elementos em seus tecidos. Para a fitorremediação de metais duas estratégias principais têm sido consideradas, a fitoextração e a fitoestabilização (Cui et al., 2007). De maneira geral, plantas fitoextratoras absorvem, translocam e acumulam os metais na parte aérea, enquanto as fitoestabilizadoras limitam a mobilidade e a biodisponibilidade dos metais no solo por meio das raízes (Ali et al., 2013). A estimativa do fator de translocação (FT) e do fator de bioacumulação (FB) permite determinar a aplicabilidade de uma espécie para fins de fitorremediação (Vamerali et al., 2010). Plantas que apresentam valores do FT acima de 1 contém o metal mais concentrado na parte aérea do que nas raízes e são descritas como úteis para a fitoextração. Já as espécies que possuem FB acima de 1 possuem metal mais concentrado nos tecidos do que no ambiente e podem apresentar potencial para a fitoestabilização (essencialmente por meio das raízes). Neste trabalho, os fatores de translocação de Cd, Cu e Zn obtidos para *M. leucocephalus* foram menores que 1, o

que demonstram que esta espécie tem limitado potencial para a fitoextração. Entretanto, FB' desses metais apresentaram valores consideravelmente elevados, demonstrando uma considerável capacidade das raízes em concentrar os metais.

Assim, os resultados sugerem que *M. leucocephalus* pode ser útil como espécie fitoestabilizadora de Cd, Cu e Zn em ambientes contaminados com estes metais, assim como a possibilidade de cultivo dessa espécie em ambientes contaminados com Cd ou mesmo a elicitação de plantas com esse metal, visando o aumento no teor de óleos essenciais nos tecidos, contudo, estudos mais detalhados com esse fim devem ser realizados, considerando a grande influencia dos fatores ambientais na produção desses compostos.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Bahia (FAPESB) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro à realização do projeto.

REFERÊNCIAS

Ali, H.; Khan, E.; Sajad, M. A. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, v. 91, n. 7, pp. 869-881, 2013.

Ali, H.; Naseer, M.; Sajad, M. A. Phytoremediation of heavy metals by *Trifolium alexandrinum*. *International Journal of Environmental Sciences*, v. 2, n. 3, pp. 1459-1469, 2012.

Adams, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4. ed. Allured Publishing Corporation©: Carol Stream, Illinois-USA, 804p. 2007.

Andrade, S. A. L. de; Silveira, A. P. D. da. Mycorrhiza influence on maize development under Cd stress and P supply. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 20, n. 1, pp. 39-50, 2008.

Azevedo, B. O. de. Crescimento, produção e composição química do óleo essencial de *Martianthus leucocephalus* (MART. EX BENTH.) J.F.B. Pastore em condições de Feira de Santana, Bahia, Brasil. Dissertação de Mestrado, UEFS, Feira de Santana, 2014, 63 p.

Bertrand, M.; Guary, J. C.; Schoefs, B. How plants adapt their physiology to an excess of metals. In: Pessarakli M, editor. Handbook of plant and crop physiology. Marcel Dekker, New York, 2001, p. 85-89.

Chen, H.; Chen, F. Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. Process Biochemistry, v. 35, pp. 837-840, 2000.

Cui, S.; Zhou, Q.; Chao, L. Potential hyperaccumulation of Pb, Zn, Cu and Cd in enduring plants distributed in an old smeltery, northeast China. Environmental Geology, v. 51, n. 6, pp. 1043-1048, 2007.

Costa, L. C. B.; Pinto, J. E. B. P.; Evaristo, M. C.; Alves, E.; Rosal, L. F.; Bertolucci, S. K. V.; Alves, P. B.; Evangelino, T. S. Yield and Composition of the Essential Oil of *Ocimum selloi* Benth. Cultivated Under Colored Netting. Journal of Essential Oil Research, v. 22, n. 1, pp. 34-39, 2010.

Deef, H. E. Copper treatments and their effects on growth, carbohydrates, minerals and essential oils contents of *Rosmarinus officinalis* L. World Journal of Agricultural Sciences, v. 3, n. 3, pp. 322-328, 2007

DalCorso, G.; Farinati, S.; Furini, A. Regulatory networks of cadmium stress in plants. Plant Signaling & Behavior v. 5, n. 6, pp. 663-667, 2010.

Dörnenburg, H.; Knorr, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant-cell cultures. Enzyme and Microbial Technology, v. 17, pp. 674-684, 1995.

Ferreira, D. F. SISVAR 4.6 sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2003, 32p.

Grejtovský, A.; Markusova, K.; Eliasova, A. The response of chamomile *Matricaria chamomilla* L. plants to soil zinc supply. *Plant, Soil and Environment*, v. 52 n. 1, pp. 1-7, 2006.

Gill, M. Heavy metal stress in plants: a review. *International Journal of Advanced Research*. v. 2, n. 6, pp. 1043-1055, 2014.

Hameed, A.; Qadri, T. N.; Mahmooduzzafar; Siddiqi, T. O. Plant Tolerance and Fatty Acid Profile in Responses to Heavy Metals. In: Ahmad, P. and Prasad, M. N. V. (Ed.). *Abiotic Stress Responses in Plants*, Springer, New York, pp. 89-104. 2012.

Harley, R. M.; Pastore, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa*, v. 58, pp. 1-55, 2012.

Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, v. 347, pp. 1-32, 1950.

Hudaib, M.; Cavrini, V.; Bellardi, M. G.; Rubies-Autonell, C. Characterization of the essential oils of healthy and virus infected *Echinacea purpurea* (L.) Moench Plants. *J. Essential Oil Research*, v. 14, n. 6, pp. 427-430, 2002.

Janzantti, N. S.; Franco, M. R.; Wosiacki, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, Campinas, v. 23, n. 3, p. 523-528, 2003.

Jesus, D. S.; Azevedo Neto, A. D. Aluminum Tolerance in Sunflower Plants Is Associated with Phosphorus Content in the Roots. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 44 n. 22, pp. 3423-3430, 2013.

Joulain, D.; König, W. A. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*. E. B. Verlag©: Hamburg-Germany, 1998. 658p.

Kabata-Pendias, A. Trace Elements in Soils and Plants. Taylor and Francis Group, CRC Press, 4th edition, 2011, 534 p.

Kumari, S., Pundhir, S., Priya, P., Jeena, G., Punetha, A., Chawla, K., et al., EssOilDB: a database of essential oils reflecting terpene composition and variability in the plant kingdom. Database, v. 2014, pp. 1-12, 2014.

Li, X.; Zhao, M. X.; Guo, L. P.; Huang, L. Q. Effect of Cadmium on Photosynthetic Pigments, Lipid Peroxidation, Antioxidants, and Artemisinin in Hydroponically Grown *Artemisia Annuua*. Journal of Environmental Sciences-China, v. 24, n. 8, pp. 1511-1518, 2012.

Li, X.; Wang, S.; Guo, L.; Huang, L. Effect of cadmium in the soil on growth, secondary metabolites and metal uptake in *Salvia miltiorrhiza*, Toxicological & Environmental Chemistry, v. 95, n. 9, pp. 1525-1538, 2013.

Lucchese, A. M. Oliveira, L. S.; Rodrigues, O. S.; Moreira, J. S.; Zaim, C. Y. H.; Zaim, M. H.; Queiroz, L. P.; Giuliatti, A. M.; Uetanabaro, A. P. T.; Conceicao, T. A. Óleos essenciais do gênero Hyptis da região do semi-árido da Bahia. In: Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 3. 2005, Campinas, Anais... Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2005. p.118.

Misra, A. Effect of zinc stress in Japanese mint as related to growth, photosynthesis, chlorophyll content and secondary plant products – the monoterpenes. Photosynthetica, v. 26, pp. 225-234, 1992.

Mithöfer, A.; Schulze, B.; Boland, W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. FEBS Letters, v. 566, pp. 1-5, 2004.

Mozaffari, F. S.; Ghorbanli, M.; Babai, A.; Sepehr, M. F. The effect of water stress on the seed oil of *Nigella sativa* L. Journal of Essential Oil Research, v. 12, n. 1, pp. 33-35, 2000.

Nasim, S. A.; Dhir, B. Heavy metal alter the potency of medicinal plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 203, pp. 139-149, 2010.

Nocito, F. F.; Lancilli, C.; Giacomini, B.; Sacchi, G. A. Sulfur Metabolism and Cadmium Stress in Higher Plants. *Plant Stress*, v. 1, n. 2, pp. 142-156, 2007.

Oliveira, L. M.; Nepomuceno, C. F.; Freitas, N. P.; Pereira, D. M. S.; Silva, G. C.; Lucchese, A.M. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. Ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, pp. 73-78, 2011.

Ovečka, M.; Takáč, T. Managing heavy metal toxicity stress in plants: Biological and biotechnological tools *Biotechnology Advances*. v. 32, n. 1, pp. 73-86, 2014.

Pál, M.; Horváth, E.; Janda, T.; Páldi, E.; Szalai, G. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 169, v. 2, pp. 239-246, 2006.

Pitta Alvarez, S. I., Spollansky, T. C.; Giulietti, A. M. Scopolamine and hyoscyamine production by hairy root cultures of *Brugmansia candida*: influence of calcium chloride, hemicellulase and theophylline. *Biotechnology Letters*, v. 22, pp. 1653-1656, 2000.

Prasad, M. N. V.; Freitas, H. M. de O. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 3, 2003.

Santos, S. N.; Castanha, R. F.; Silva, J. L.; Marques, M. O. M.; Scramin, S.; Melo, I. S. de. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Hyptis leucocephala* In: Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 2011, Campinas. Anais. Campinas, EMBRAPA, 2011. Resumo BIO-10, p. 70.

Seyedsadr, S.; Alipour, Z.T.; Farasat, M.; Sinaki, J. Investigation of the Ability of *Mentha spicata* L. for Reducing Cadmium in Contaminated Soils. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, v.4, n. 12, pp. 3425-3431, 2013.

Singh, B.; Sharma, R. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*, v. 5, n. 2, pp. 129-151, 2015.

Stancheva, I.; Geneva, M.; Hristozkova, M.; Boychinova, M.; Markovska, Y. Essential oil variation of *Salvia Officinalis* (L.), grown on heavy metals polluted soil, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 23, pp. 371-376, 2009.

Vamerali, T.; Bandiera, M.; Mosca, G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review, *Environmental Chemistry Letters*, v. 8, n. 1, pp. 1-17, 2010.

van de Mortel, J. E.; Villanueva, L. A.; Schat, H.; Kwekkeboom, J.; Coughlan, S.; Moerland, P. D.; van Themaat, E. V. L.; Koornneef, M.; Aarts, M. G. M. Large Expression Differences in Genes for Iron and Zinc Homeostasis, Stress Response, and Lignin Biosynthesis Distinguish Roots of *Arabidopsis thaliana* and the Related Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, v. 142, n. 3, pp. 1127-1147, 2006.

Wilhelm C.; Selmar D. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis *Journal of Plant Physiology*, v. 168, n. 2, pp. 79-87, 2011.

Zheljazkov, V. D.; Jeliaskova, E. A.; Kovacheva, N.; Anatoli Dzhurmanski Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter. *Environmental and Experimental Botany*, v. 64, n. 3, pp. 207-216, 2008.

CAPÍTULO 3

Estresse oxidativo e produção de fenólicos e de flavonóides totais
em plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B.
Pastore submetidas ao estresse por metais

Estresse oxidativo e produção de fenólicos e de flavonóides totais em plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetidas ao estresse por metais

Resumo

A atividade antioxidante de plantas tem sido associada à presença de compostos fenólicos. Atualmente o potencial dos vegetais em produzir estes compostos tem recebido bastante atenção, sendo sua síntese controlada geneticamente e fortemente estimulada por fatores ambientais. Diversos relatos têm associado à produção destes compostos às condições adversas, como o estresse provocado por metais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o estresse oxidativo e o rendimento de fenólicos e de flavonóides totais em plantas de *M. leucocephalus* cultivada sob estresse de Cd, Cu e Zn em sistema hidropônico. Estacas apicais foram transferidas para bandejas plásticas contendo 6 L de solução nutritiva, onde permaneceram até o enraizamento, sendo, então, submetidas doses de Cd, Cu e Zn, durante 30 dias. Após esse período as plantas foram colhidas, separando-se as folhas, caules e raízes para quantificação de fenólicos e flavonóides totais, da peroxidação lipídica e da atividade das peroxidases do ascorbato (APX) e do guaiacol (GPX). Os resultados demonstraram que os maiores teores de compostos fenólicos são encontrados nas partes aéreas de *M. leucocephalus*, caracterizando esta espécie como uma potencial fonte para a obtenção destes compostos. Além disso, o estresse de Cd aumentou a concentração de fenólicos totais, enquanto que a atividade das peroxidases e a peroxidação lipídica foi maior nas plantas submetidas aos três metais. Por outro lado, todos os tratamentos com metais provocaram redução no teor de flavonóides nas folhas e raízes, sugerindo a possibilidade destes compostos atuarem como quelantes de metais nas plantas de *M. leucocephalus*. Estes resultados sugerem que os compostos fenólicos são moléculas importantes para o metabolismo das plantas submetidas ao estresse por metais.

Palavras-chave: peroxidação lipídica, peroxidases, metabolitos secundários, Lamiaceae

Abstract

The plant antioxidant activity has been associated with the presence of phenolic compounds. Currently the potential of plants to produce these compounds have received much attention, and its genetically controlled synthesis and strongly stimulated by environmental factors. Several reports have associated these compounds production with adverse conditions, such as stress caused by metals. The objective of this study was to evaluate oxidative stress and the yield of phenolics and total flavonoids in *M. leucocephalus* plants grown under stress of Cd, Cu and Zn hydroponically. Apical cuttings were transferred to plastic trays containing 6 L of nutrient solution, where they remained until the roots, and then submitted Cd, Cu and Zn for 30 days. After this period the plants were harvested by separating them to leaves, stems and roots for quantitation of phenolic and flavonoids, lipid peroxidation and ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol (GPX) activity. Higher levels of phenolic compounds are found in the aerial parts of *M. leucocephalus* characterizing this species as a potential source for obtaining these compounds. The Cd stress increased concentration of phenolics, while the activity of peroxidases and lipid peroxidation was higher in plants subjected to three metals. Moreover, all treatments caused a reduction in metal flavonoid content in leaves and roots, suggesting the possibility that these compounds act as metal chelators in plants *M. leucocephalus*. The results show that phenolic compounds are important molecules for the metabolism of plants subjected to stress by metals.

Keywords: lipid peroxidation, peroxidases, secondary metabolites, Lamiaceae

INTRODUÇÃO

O interesse por plantas medicinais e produtos associados tem sido cada vez mais considerado pela população em geral, bem como pela comunidade científica e setores governamentais. Estas plantas e seus derivados são utilizados de forma alternativa, ou ainda de maneira complementar a medicina tradicional, para o tratamento de diversas enfermidades. Em muitos casos, materiais de origem vegetal são empregados para eliminar radicais livres, sendo assim reconhecidas como antioxidantes naturais (Souza et al., 2007). Neste sentido, apresentam demanda elevada devido a sua relativa segurança e ao seu potencial para a prevenção de algumas doenças, como as cardiovasculares, o câncer e as enfermidades neurodegenerativas (Dvorackova et al., 2014; Giada, 2013).

Nas plantas, a atividade antioxidante tem sido associada à presença de compostos fenólicos (Giada, 2013; Vladimir-Knežević, 2014), onde se enquadram diversas categorias de compostos, incluindo os flavonóides (Sousa et al., 2007). Conforme Giada (2013), a destacada atividade antioxidante dos fenólicos está relacionada à presença de hidroxilas, as quais permitem a estabilidade da molécula após a doação de elétrons às espécies reativas de oxigênio (EROS).

Devido ao interesse comercial, muitas plantas têm sido investigadas quanto à capacidade de produção dos compostos fenólicos e a família Lamiaceae vem demonstrando relevância (Vladimir-Knežević, 2014). Grandes quantidades destas substâncias foram encontradas, por exemplo, em *Lavandula angustifolia* Mill. (lavanda) e *Melissa officinalis* L. (erva cidreira) (Dvorackova et al., 2014). *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore é uma Lamiaceae herbácea de ocorrência restrita ao semiárido brasileiro. Esta espécie tem sido bastante estudada devido ao óleo essencial produzido em seus tecidos, com diversas propriedades farmacológicas (Santos et al., 2011), entretanto, tem sido pouco investigada quanto ao seu potencial para produzir compostos fenólicos.

A produção de compostos fenólicos pode ser mais pronunciada diante de condições adversas (Petridis et al., 2012). Alguns autores relataram que a exposição dos vegetais a seca e a salinidade provocou o acúmulo destas moléculas (Petridis et al., 2012; Selmar e Kleinwächter, 2013). Adicionalmente, o estresse por metais, um dos fatores mais prejudiciais ao crescimento das plantas (Zheljazkov et al., 2005; Gill, 2014), também tem demonstrado influência na síntese dos compostos fenólicos (Michalak, 2006; Nasim e Dhir, 2010).

O papel benéfico dos fenólicos para as plantas expostas aos metais pode estar associado a sua capacidade antioxidante. Este tipo de estresse pode desencadear o surgimento de variados sintomas nas plantas, sendo que o acúmulo EROS é considerado comum (Singh et al. 2015). Nestas condições, os tecidos vegetais podem apresentar incremento da peroxidação lipídica e da atividade de enzimas do sistema antioxidante, tais como as peroxidases (Kovačik et al. 2009; Ovečka e Takáč, 2014), responsáveis pela remoção do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécie de elevado potencial oxidante e precursor de radicais de oxigênio altamente destrutivos (Vicuna et al., 2011). Alternativamente, os fenólicos, principalmente flavonóides, podem atuar como quelantes dos metais e, desta forma, limitar a toxidez destes elementos (Pawlak-Sprada et al., 2011). Assim, a correlação entre o estresse por metais e a produção de compostos

fenólicos cria como perspectiva a possibilidade de estimulação de plantas buscando a elevação dos seus teores nos tecidos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de peroxidação lipídica, a atividade de peroxidases, bem como o rendimento de fenólicos e de flavonóides totais em *M. leucocephalus* cultivada sob estresse de Cd, Cu e Zn.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de crescimento e tratamentos

Estacas apicais de *M. leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore, com aproximadamente 15 cm de comprimento foram obtidas da coleção de plantas medicinais e aromáticas do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia. Após a coleta as estacas foram imediatamente transferidas para bandejas plásticas contendo seis litros da solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1950) e mantidas em estufa agrícola (Figura 1A e 1B). O pH da solução foi ajustado em $6,0 \pm 0,2$, sendo monitorado diariamente e corrigido com HCl ou NaOH. Vinte dias após a instalação das plantas no sistema hidropônico foram iniciados os tratamentos: controle (0,0 μ M de metal), Cd(NO₃)₂ (7,5 μ M), CuSO₄ (15 μ M) e ZnSO₄ (75 μ M). Estas concentrações foram definidas em ensaio preliminar, com base no nível de danos aos tecidos. As soluções nutritivas foram renovadas semanalmente e o volume completado diariamente com água destilada. O sistema foi mantido sob aeração intermitente (15 minutos a cada três horas) por meio de compressor de ar acoplado a um temporizador. As plantas permaneceram nestas condições durante 30 dias.

Aos 30 dias após a aplicação dos tratamentos com metais as plantas foram colhidas e separadas em folhas, caules e raízes. Em seguida, o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel e transferido para estufa com circulação forçada de ar (65 °C) até peso constante, para determinação das massas secas das folhas (MSF), caule (MSC) raízes (MSR). Adicionalmente, material fresco de folhas e raízes foi coletado, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado para posterior estimativa da atividade das enzimas peroxidases do ascorbato (APX) e do guaiacol (GPX) e da concentração de malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de 4 (quatro) plantas. Os resultados

foram submetidos à análise da variância pelo teste F a 5% de probabilidade de erro e, nos casos de significância, realizou-se o teste de Tukey, utilizando o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2003)

Preparo dos extratos e determinação das atividades enzimáticas e de MDA

Aproximadamente 0,25 g de folhas e 0,1 g de raízes liofilizadas foram homogeneizadas em almofariz e pistilo com 4 mL de tampão de extração (tampão de fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, EDTA 0,1 mM). O homogeneizado foi filtrado em tecido de musselina e centrifugado a $16000 \times g$ durante 15 min. A fração sobrenadante foi usada como extrato bruto para os ensaios das atividades enzimáticas e peroxidação lipídica. Todas as operações foram realizadas a 4 °C.

A atividade da APX (CE 1.11.1.1) foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981). A mistura de reação (1,5 mL) foi formada por tampão de fosfato (50 mM, pH 6,0, EDTA 0,1 mM), ascorbato a 0,5 mM, H₂O₂ a 1,0 mM e 50 µL de extrato. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ e a oxidação do ascorbato foi medida a 290 nm durante 1 min. A atividade da enzima foi expressa em µmol de ascorbato min⁻¹ g⁻¹ MS. A atividade da GPX (CE 1.11.1.7) foi determinada como descrito por Urbanek et al. (1991) em uma mistura de reação (2,0 mL) contendo tampão fosfato (100 mM, pH 7,0, EDTA 0,1 M), guaiacol a 5,0 mM, H₂O₂ a 15 mM e 50 µL de extrato. A reação foi iniciada pela adição do extrato e o aumento da absorbância a 470 nm foi monitorado durante 1 min. A atividade da enzima foi expressa em µmol de tetraguaiacol min⁻¹ g⁻¹ MS.

A peroxidação lipídica foi determinada medindo-se a quantidade de MDA produzida pela reação do ácido tiobarbitúrico, como descrito por Heath e Packer (1968). O extrato bruto foi misturado com o mesmo volume de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0,5% (m/v) contendo ácido tricloroacético a 20% (m/v). A mistura foi aquecida a 95 °C durante 30 min e, em seguida, resfriada rapidamente em banho de gelo. A mistura foi centrifugada a $3000 \times g$ durante 10 min e a absorbância do sobrenadante foi monitorada a 532 e 600 nm. Depois de se subtrair a absorbância não específica (600 nm), a concentração de MDA foi determinada e os resultados expressos como µmol MDA g⁻¹ MS. As determinações das atividades da APX, GPX e de MDA foram realizadas utilizando um espectrofotômetro modelo S 2000 UV-Vis (BEL PHOTONICS do Brasil).

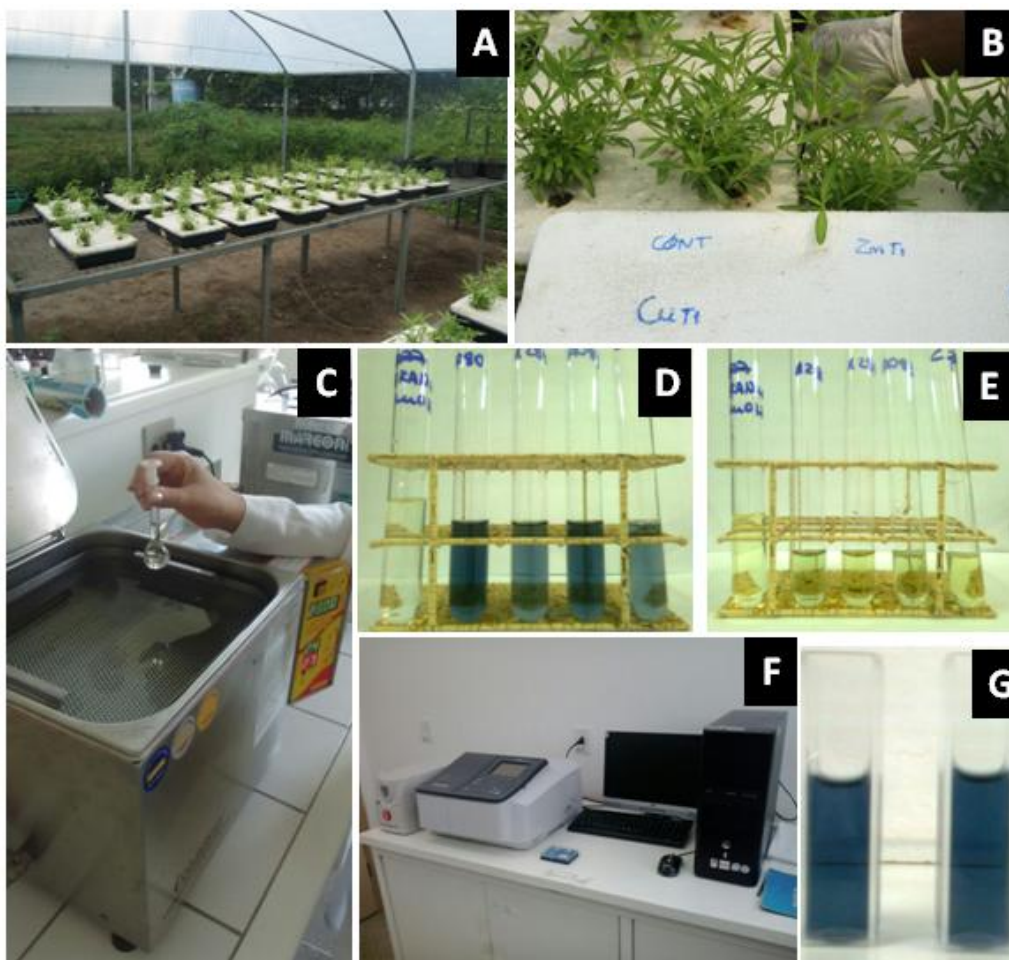


Figura 1 - (A e B) *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore cultivada hidroponia; (C) sonicação; (D e E) amostras de fenólicos e de flavonóides prontas para análise em espectrofômetro; (F) espectrofotômetro modelo UV-1800 UV-VIS; (G) cubetas contendo amostras para a leitura de fenolicos.

Determinação de fenóis e de flavonóides totais

Para a determinação dos fenólicos e dos flavonóides totais nos tecidos de *M. leucocephalus* foi utilizado material seco e triturado de folhas, caules e raízes. A preparação dos extratos foi realizada conforme descrito por Oliveira (2011). Em balança analítica, foram pesados 0,375 g de folhas e caules e 1,5 g de raízes. Estas amostras foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL, e o volume completado com álcool etílico. Para potencializar a extração a mistura foi submetida à sonicação por 10 minutos (Figura. 1 C), sendo então filtrada por meio de papel filtro. Uma alíquota de 0,1 mL deste filtrado foi transferido para tubos de 5 mL, onde se adicionou 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu e 1 ml de água ultrapura. A mistura foi homogeneizada em

vórtex e posta em repouso protegida da luz durante 5 min. Após este período foi adicionado 0,6 ml de solução de carbonato de sódio a 15% e o volume completado com água ultrapura. A mistura foi novamente homogeneizada em vórtex e deixada em repouso no escuro, desta vez por 90 min (Figura 1D). Em seguida, foram realizadas as leituras em duplicata das absorvâncias em espectrofotômetro modelo UV-1800 UV-Vis (Shimadzu Corp., Tóquio, Japão) a 750 nm (Figura 1F e 1G). O ácido gálico foi utilizado como padrão e as concentrações de 2; 5; 10; 15 e 20 µg/mL foram empregadas para a construção da curva de calibração. A partir da equação da reta obtida foi calculado o teor de fenólicos totais, expresso em mg de ácido gálico/g de amostra.

Para a determinação dos flavonóides totais 1,5 mL do extrato foi transferido para tubos de 5 mL, adicionando-se 0,1 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 5% e 3,4 ml de solução metanólica de ácido acético 5%. Esta mistura foi posta em repouso por 30 minutos (Figura 1E) e, em seguida, procedeu-se a leitura da absorvância no espectrofotômetro modelo UV-1800 UV-VIS (Shimadzu Corp., Tóquio, Japão) em 425 nm. A curva padrão de absorvância no ultravioleta, em 420 nm, foi obtida a partir de diluições da solução de quercetina a 1 mg/ml, resultando nas concentrações de 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,5 µg/mL. Os resultados foram expressos em mg de quercetina/g de amostra.

RESULTADOS

A concentração de fenólicos totais das plantas de *M. leucocephalus* submetidas ao estresse por Cd, Cu e Zn variou conforme o tipo de metal e parte da planta analisada (Figura 2). Assim, nas raízes expostas ao Cd, Cu e o Zn os níveis destes compostos foram diminuídos em 30, 33 e 60%, respectivamente (Figura 2). Já nas plantas submetidas aos tratamentos com Cu e Zn a concentração destas substâncias não foi alterada nas folhas, enquanto que, nos caules, ocorreu uma diminuição (22 e 17%, respectivamente). Por outro lado, o estresse por Cd provocou aumento de 63% na concentração de fenólicos totais de nas folhas e 30% nos caules, em relação às plantas controle (Figura 2).

A concentração dos flavonóides totais também foi alterada pelo estresse por metais (Figura 2). Nas folhas das plantas submetidas ao estresse por Cd, Cu e Zn verificou-se uma redução de 10, 13 e 17%, respectivamente. Nas raízes das plantas submetidas a estes metais a redução nos teores de flavonóides foram ainda mais significativas, sendo 51 (Cd), 27 (Cu) e 58% (Zn) menor em relação ao tratamento

controle (Figura 2). A concentração destas substâncias também foi menor nos caules dos espécimes estressados por Cu e Zn, resultando, em ambos os casos, numa redução aproximada de 32%. Entretanto, as plantas estressadas por Cd não apresentaram alterações na concentração dos flavonóides totais no caule.

Os resultados obtidos demonstram que o excesso de metais na solução nutritiva provocou alterações na atividade da enzima GPX em *M. leucocephalus* (Figura 3). A exposição da planta às soluções com Cu e Zn provocou um aumento expressivo na atividade desta enzima em ambas as partes analisadas desta espécie. Em comparação com plantas controle, os respectivos aumentos foram de aproximadamente 5 e 9 vezes nas folhas e 4 a 5 vezes nas raízes dos espécimes submetidos aos tratamentos com os metais. Nas folhas de plantas expostas ao Cd também foi verificado um forte aumento na atividade da GPX (15 vezes acima do controle). Por outro lado, nas raízes de plantas expostas a este metal não foi verificado alteração na atividade da enzima (Figura 3).

A atividade da enzima APX não sofreu alterações nos espécimes de *M. leucocephalus* cultivados em meio com Cu. Entretanto, os resultados demonstraram que a atividade desta enzima foi diminuída nas folhas das plantas expostas ao Cd (35%) e aumentada nas raízes das plantas submetidas ao estresse de Zn (47%) (Figura 3). O estresse provocado pelos metais aumentou os níveis de MDA tanto nas folhas quanto nas raízes de *M. leucocephalus*, sendo 40, 26 e 74% maior nas folhas e 39, 39 e 44,5% maior nas raízes das plantas expostas Cd, Cu e ao Zn, respectivamente, em relação ao resultado verificado nas plantas controle (Figura 3).

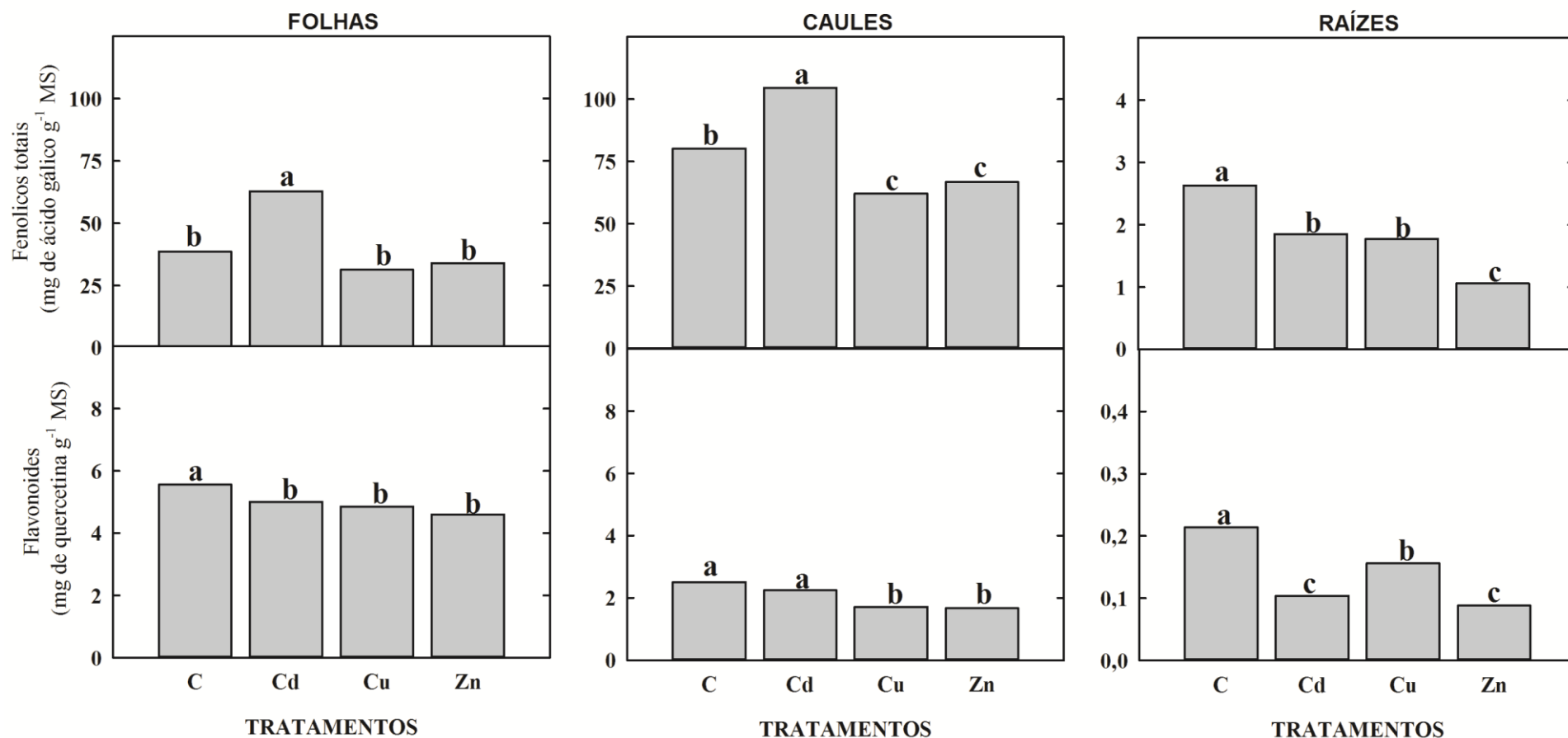


Figura 2 – Concentração de fenólicos e de flavonóides totais em folhas, caules e raízes de plantas de *Marthiantus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore nas condições controle (C) e submetidas a estresse por Cd (7,5 mmol L⁻¹), Cu (15 mmol L⁻¹) e Zn (75 mmol L⁻¹) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si conforme o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

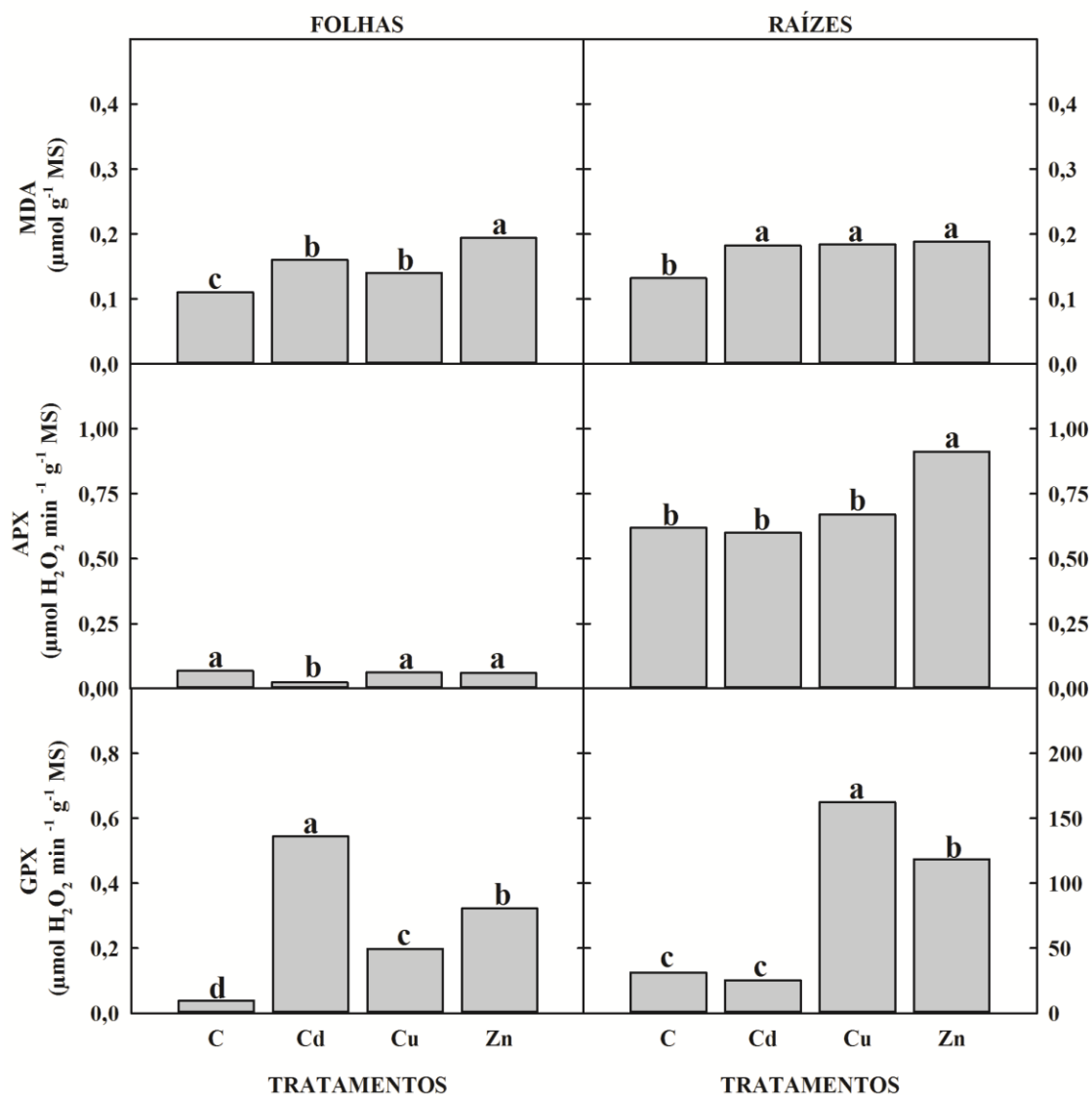


Figura 3 – Concentração de malondialdeído (MDA) e atividade das peroxidases do ascorbato (APX) e do guaiacol (GPX) em folhas e raízes de plantas de *Marthiantus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore nas condições controle (C) e submetidas a estresse por Cd ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Cu (15 mmol L^{-1}) e Zn (75 mmol L^{-1}) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si conforme o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

DISCUSSÃO

Diversos autores têm demonstrado que, geralmente, os compostos fenólicos são encontrados em maiores concentrações nas folhas e nos caules das plantas (Martins et al., 2011). Em concordância com estas observações, os resultados deste trabalho demonstraram que os maiores teores destes compostos foram encontrados nas partes

aéreas de *M. leucocephalus*. Recentemente, Tusevski et al. (2014) quantificaram as concentrações de fenólicos e de flavonóides em plantas medicinais tradicionalmente utilizadas e, comparando-se os resultados obtidos nesse trabalho com os obtidos para algumas Lamiáceas, verifica-se que a concentração de fenólicos e de flavonóides foi menor do que as verificadas em *Salvia ringens* Sibth. & Sm. (salvia), *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Clinopodium vulgare* L. (clinopódio). Entretanto, em relação a outras ervas medicinais estudadas, as partes aéreas desta espécie apresentam maiores teores das referidas substâncias. Estas observações demonstram que *M. leucocephalus* apresenta considerável teor de fenólicos e de flavonóides nas partes aéreas, podendo ser caracterizada como uma potencial fonte para a obtenção destes compostos.

Com relação ao efeito do estresse por metais traços sobre a concentração dos fenólicos, os resultados obtidos mostraram que apenas o Cd provocou aumento nos teores desses compostos nas folhas e nos caules dos espécimes de *M. leucocephalus*. Segundo Li et al. (2013), este metal pode influenciar positivamente a síntese de compostos secundários devido a ativação de sistemas bioquímicos anti-estresse, que incluem a ativação de enzimas de vias biossintéticas associadas a estas substâncias. Contudo, o efeito do estresse sobre o metabolismo secundário de plantas é dependente de muitos atributos, incluindo o tipo e intensidade do fator, bem como da duração da exposição, o que explica a diminuição na concentração destes compostos nas raízes das plantas submetidas ao estresse por metais. Além disso, as regiões estudadas, parte aérea e raiz, apresentam diversificação quantitativa e qualitativa de compostos secundários, caracteres que também exercem influência nos resultados (Król et al., 2014).

Os resultados apontam uma redução significativa nos teores de flavonóides das plantas submetidas ao estresse por metais (Figura 3). Os flavonóides são descritos como uma classe de fenólicos com uma considerável capacidade para complexar metais. O mecanismo envolvido no processo inclui a participação de duas hidroxilas ou carboxilas da mesma molécula de flavonóide, ou ainda hidroxilas de pelo menos duas moléculas de flavonóides vizinhas (Tarahovsky et al., 2014). Desta forma, a quelatação de cátions bivalentes, incluindo Cd, Cu e Zn tem sido marcadamente relatada (Lachman et al., 2005; Mierziak, 2014; Tarahovsky et al., 2014). A formação destes complexos tanto limita a participação dos íons metálicos na geração de radicais livres, quanto restringe a presença potencialmente tóxica dos metais livres no interior do corpo vegetal (Lachman et al., 2005). Assim, os resultados obtidos sugerem que os flavonóides são moléculas bastante úteis para a manutenção das plantas expostas ao estresse por metais.

A estimativa da atividade de peroxidases em plantas tem sido considerada como um marcador bioquímico do estresse promovido pelos metais (Meisrimler et al., 2014). Este fato está associado ao papel destas proteínas na manutenção do equilíbrio entre a produção e a eliminação das EROS (Hassan e Mansoor, 2013). Desta maneira, os resultados encontrados, com aumento da atividade da GPX nas folhas e da APX nas raízes de plantas tratadas com o Zn, sugerem que os metais provocaram um aumento dos níveis de EROS em *M. leucocephalus*. Além disso, o incremento da atividade da GPX em todos os tratamentos confirma esta enzima como um biomarcador do estresse por metais em *M. leucocephalus*. Já a quantificação do malondialdeído (MDA) tem sido frequentemente utilizada como indicador da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, dos danos provocados pelos estresses abióticos nas membranas dos vegetais. A aplicabilidade do MDA como marcador de peroxidação está associada ao fato deste composto ser um dos aldeídos reativos originados a partir da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. Nesta perspectiva, e considerando que os níveis de MDA foram superiores em todos os tratamentos com metais, independentemente das partes avaliadas em plantas de *M. leucocephalus*, sugere-se que a peroxidação lipídica é um sintoma provocado pelo estresse de Cd, Cu e Zn, corroborando, em parte, com os resultados verificados para a atividade das enzimas APX e GPX.

O conjunto de eventos encontrados neste trabalho suporta a hipótese de que os compostos fenólicos são moléculas importantes para as plantas submetidas ao estresse por metais. Entretanto, deve-se considerar que o sistema antioxidante das plantas é complexo e envolve muitas moléculas e enzimas (Mittler, 2002). Assim, a importância de um componente do sistema pode ser variável dependendo de muitos fatores, como a duração e intensidade do estresse (Racchi, 2013). Além disso, a observação de que os metais exercem influência na concentração de fenólicos e de flavonóides pode indicar que estas substâncias e suas vias biossintéticas são importantes para as plantas durante condições de estresse. Por outro lado, a demonstração de que o Cd induziu o aumento a concentração de fenólicos totais sugere uma possibilidade de se estimular a produção destes compostos em *M. leucocephalus*. Contudo, novas investigações devem focar nas demais classes de compostos fenólicos.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Bahia (FAPESB)

e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro à realização do projeto.

REFERÊNCIAS

Dvorackova, E.; Snoblova, M.; Hrdlicka, P. Content of phenolic compounds in herbs used in the Czech Republic. *International Food Research Journal*, v. 21, n. 4, pp. 1495-1500, 2014.

Ferreira, D. F. SISVAR 4.6 sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2003, 32p.

Giada, M.D.L.R. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power In: Morales-González JA, editor. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases – A role for antioxidants*. InTech, pp. 87-112, 2013.

Gill, M. Heavy metal stress in plants: A review. *International Journal of Advanced Research*, v. 2, n. 6, pp. 1043-1055, 2014.

Hassan, M.; Mansoor, S. Oxidative stress and antioxidant defence mechanism in mung bean seedlings after lead and cadmium treatments. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, v. 38, n.1, pp. 55-61, 2014.

Heath, R.L., Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 125, n. 1, 189-198, 1968.

Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, v. 347, p. 1-32, 1950.

Jesus, D. da Silva de; Azevedo, B. O.; Pinelli, M. S.; Korn, M. das G. A.; Azevedo Neto, A. D. de; Lucchese, A. M.; Oliveira, L. M. de. Growth and volatile compounds of *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) JFB Pastore subjected to heavy metal stress. *Ciência rural*, no prelo.

Kováčik, J.; Klejdus, B.; Kaduková, J.; Bačkor, M. Physiology of *Matricaria chamomilla* exposed to nickel excess. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 2, pp. 603-609, 2009.

Król, A.; Amarowicz, R.; Weidner, S. Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 36, pp. 1491-1499, 2014.

Lachman, J.; Dudjak, J.; Miholová, D.; Koliňová, D.; Pivec, V. Effect of cadmium on flavonoid content in young barley (*Hordeum sativum* L.) plants. *Plant, Soil and Environment*, v. 51, n. 11, pp. 513-516, 2005.

Li, X.; Wang, S.; Guo, L.; Huang, L. Effect of cadmium in the soil on growth, secondary metabolites and metal uptake in *Salvia miltiorrhiza*, *Toxicological & Environmental Chemistry*, v. 95, n. 9, pp. 1525-1538, 2013.

Martins, S.; Mussatto, S. I.; Martínez-Avila, G.; Montañez-Saenz, J.; Aguilar, C. N.; Teixeira, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 3, pp. 365-373, 2011.

Meisrimler, C.-N.; Buck, F.; Lüthje, S. Alterations in Soluble Class III Peroxidases of Maize Shoots by Flooding Stress. *Proteomes*, v. 2, pp. 303-322, 2014.

Mierziak J, Kostyn K, Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, v.19, pp. 16240-65, 2014.

Michalak, A.; Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress, *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 15, n. 4, pp. 523-530, 2006.

Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, v. 7, n. 9, pp. 405-410, 2002.

Nakano, Y., Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, v. 22, n. 5, pp. 867-880, 1981.

Nasim, S. A.; Dhir, B. Heavy metal alter the potency of medicinal plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 203, pp. 139-149, 2010.

Oliveira, A. P. de. Avaliação da atividade gastroprotetora do extrato metanólico e desenvolvimento tecnológico de preparações extrativas das partes aéreas de *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). Dissertação de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí – SC. 2011. p. 119.

Ovečka, M.; Takáč, T. Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. *Biotechnology Advances*, v. 32, n. 1, pp. 73-86, 2014.

Pawlak-Sprada, S.; Arasimowicz-Jelonek, M.; Podgórska, M.; Deckert, J. Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants expose to heavy metals: Part I. Effects of cadmium and lead on phenylalanine ammonia-lyase gene expression, enzyme activity and lignin content. *Acta Biochimica Polonica*, v. 58, n. 2, pp. 211-216, 2011.

Petridis, A.; Therios, I.; Samouris, G.; Tananaki, C. Salinity-induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (*Olea europaea* L.) and their relationship to antioxidant activity. *Environmental and Experimental Botany*, v. 79, pp. 37-43, 2012.

Racchi, M. L. Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants*, v. 2, pp. 340-369, 2013.

Santos, S. N. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Hyptis leucocephala* In: Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 2011, Campinas. Anais. Campinas, EMBRAPA, 2011. Resumo BIO-10, p.70.

Selmar, D.; Kleinwächter, 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, pp. 817-826, 2013.

Singh, M.; Kumar, J.; Singh, S.; Singh, V.P.; Prasad, S.M.; Singh, M.P.V.V.B. Adaptation Strategies of Plants against Heavy Metal Toxicity: A Short Review. *Biochemistry & Pharmacology*, v. 4, n. 2, 2015.

Sousa, C. M. de M.; Rocha e Silva, H.; Vieira-Jr., G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S. da; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. de M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, pp. 351-355, 2007.

Tarahovsky, Y. S.; Kim, Y. A.; Yagolnik, E. A.; Muzafarov, E. N. Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1838, n. 5, p. 1235-1246, 2014.

Tusevski, O., Kostovska, A., Iloska, A., Trajkovska, L., Simic, S. G. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Central European Journal of Biology*, v. 9, n.9, pp. 888-900, 2014.

Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E., Herka, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 13, n. 1, pp. 43-50, 1991.

Vicuna, D.; Malone, R. P.; Dix, P. J. Increased tolerance to abiotic stresses in tobacco plants expressing a barley cell wall peroxidase. *Journal of Plant Sciences*, v. 6, n. 1, pp. 1-13, 2011.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Kindl M, Vladić J, Lower-Nedza AD, Brantner AH. Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the *Lamiaceae* Family. *Molecules*, n.19, pp. 767-782, 2014.

Zheljazkov, V. D.; Jeliaskova, E. A.; Kovacheva, N.; Anatoli Dzhurmanski Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter. *Environmental and Experimental Botany*, v. 64, n. 3, pp. 207-216, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa permitem sugerir que o estresse por metais influencia a produção de voláteis em *M. leucocephalus*. Entretanto, deve-se considerar que este efeito depende da dose e do tipo de metal aplicados. Quando impostos em doses relativamente elevadas, estes elementos provocam fortes danos no crescimento e apesar de não reduzirem o teor de compostos voláteis, podem limitar a produtividade da espécie. Por outro lado, quando os estresses são aplicados em níveis relativamente mais amenos, o Cd provoca um aumento na concentração compostos voláteis e também de fenólicos, capaz de compensar as perdas no crescimento. Estes resultados credenciam este metal como um provável eliciador para a produção destes metabolitos secundários.

O Potencial de *M. leucocephalus* como espécie como fitoestabilizadora de Cd, Cu e Zn em ambientes contaminados com estes metais também foi demonstrado. Neste caso, apesar da espécie possuir baixa produção de biomassa por espécime, uma elevada densidade populacional (no cultivo) pode representar um papel efetivo na imobilização de metais em ambientes contaminados.

Além disso, considerando que a síntese dos compostos secundários implica em uma demanda metabólica adicional à condição de estresse e que o estresse por metais não prejudicou a biossíntese, esta pesquisa sugere uma necessidade fisiológica para a sua produção.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Resumo das análises de variância referentes ao I capítulo

A I - Massa Seca das folhas (MSF), Massa Seca dos Caules (MSC), Massa Seca da Raiz (MSR), Massa Seca Total (MST), Suculência (Suc), teor de óleo (Óleo), concentração de cádmio (Cd) nas folhas (Cd F), nos caules (Cd C) e nas raízes (Cd R) de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle e submetidas às doses de Cd ($0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $15 \mu\text{mol L}^{-1}$, $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, $45 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $60 \mu\text{mol L}^{-1}$).

FV	GL	Quadrado Médio									
		MSF	MSC	MSR	MST	TCR	Suc	Óleo	Cd F	Cd C	Cd R
Tratamentos	4	33,7**	11,7**	2,7**	103,8**	0,003**	9,6**	0,0004 ^{ns}	11594**	496567,3**	30251375,6**
Erro experimental	15	0,5	0,1	0,1	1,3	0,00006	0,1	0,0005	6,54	5935,6	39996,6
CV (%)		12	14	11,8	10,4	9	4,8	13,5	3,3	15,7	4,8
Média geral		5,8	2,3	3	11	0,08	7,5	0,2	77,2	490,3	4126,6

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. ns Não significativo. FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação.

A II - Massa Seca das folhas (MSF), Massa Seca dos Caules (MSC), Massa Seca da Raiz (MSR), Massa Seca Total (MST), Suculência (Suc) e teor de óleo (Óleo), concentração de cobre (Cu) nas folhas (Cu F), nos caules (Cu C) e nas raízes (Cu R) de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetidas às doses de Cu ($0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, $60 \mu\text{mol L}^{-1}$, $90 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $120 \mu\text{mol L}^{-1}$).

FV	GL	Quadrado Médio									
		MSF	MSC	MSR	MST	TCR	Suc	Óleo	Cu F	Cu C	Cu R
Tratamentos	4	49,7**	9,8**	6,3**	154,6**	0,008**	19,5**	0,006**	3894,3**	1005,3**	26902196**
Erro	15	0,4	0,1	0,5	1,2	0,00006	0,1	0,0003	65	4,4	37635
CV (%)		12,6	9,4	12,4	10,8	10,35	6	8,81	8,67	8,49	8,43
Média geral		4,9	3,5	1,8	10	0,07	6,6	0,19	24	24,6	2302,4

** significativo a 1% de probabilidade e ns não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F. FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade;
CV: coeficiente de variação.

A III - Massa Seca das folhas (MSF), Massa Seca dos Caules (MSC), Massa Seca da Raiz (MSR), Massa Seca Total (MST), Suculência (Suc) e teor de óleo (Óleo), concentração de zinco (Zn) nas folhas (Zn F), nos caules (Zn C) e nas raízes (Zn R) de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore submetidas às doses de Zn ($0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $600 \mu\text{mol L}^{-1}$).

FV	GL	Quadrado Médio									
		MSF	MSC	MSR	MST	TCR	Suc	Óleo	Zn F	Zn C	Zn R
Tratamentos	4	56**	12**	6,4**	178**	0,01**	15**	0,01**	1766487**	212682**	125022454**
Erro	15	0,2	0,04	0,04	0,7	0,00003	0,1	0,0003	1818	2321	1407715
CV (%)		10,8	9,3	12	10	10,7	5,4	7,4	4	4	16
Média geral		4	2,3	1,7	8	0,05	6,6	0,2	1061	1305	7227

** significativo a 1% de probabilidade e ^{NS} não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F. FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação.

APÊNDICE B: Resumo das análises de variância referentes ao II capítulo

B I - Compostos voláteis majoritários de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle, e submetidas a estresse por cádmio ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), cobre (15 mmol L^{-1}) e zinco (75 mmol L^{-1}) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio						
		Formiato de isobornila	E-cariofileno	Germacreno	Viridifloreno	Espatulenol	Óxido de Cariofileno	α -muurolol
Tratamentos	3	5,2 ^{ns}	6,4 ^{ns}	1,3 ^{ns}	2,9 ^{ns}	0,8 ^{ns}	14 ^{ns}	0,6 ^{ns}
Erro	16	9,1	8	1,5	5	1	13	1,2
CV (%)		16,1	27,4	33	36,6	21,7	42,2	13
Média geral		18,8	10,4	3,7	6,1	4,7	8,6	8,5

ns Não significativo. FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação.

B II - Concentrações dos macronutrientes potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P) e enxofre (S) nas plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle, e submetidas a estresse por cádmio ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), cobre (15 mmol L^{-1}) e zinco (75 mmol L^{-1}) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio									
		K		Ca		Mg		P		S	
		PA	R	PA	R	PA	R	PA	R	PA	R
Tratamentos	3	2873,2 ^{ns}	81027 ^{**}	1651,5 ^{ns}	900,3 ^{ns}	206,5 ^{ns}	1239,4 ^{ns}	5749,2 ^{**}	12790 [*]	3021,5 ^{**}	513,2 ^{ns}
Erro	16	5667,5	12300	647,1	541,5	73,2	2390	386,6	2997,2	138,6	1800
CV (%)		11,7	17	11,2	16	4,32	13,9	12,37	19	8,6	15,2
Média geral		640,6	654	226,9	144,7	198	351,7	159	287,5	136,2	278,7

** Significativo ao nível de 1% e * significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. ns Não significativo. FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação; PA: parte aérea; R: raiz.

B III - Concentrações dos micronutrientes cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn) nas plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle, e submetidas a estresse por cádmio (7,5 mmol L⁻¹), cobre (15 mmol L⁻¹) e zinco (75 mmol L⁻¹) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio									
		Cd		Cu		Zn		Fe		Mn	
		PA	R	PA	R	PA	R	PA	R	PA	R
Tratamentos	3	0,05 ^{**}	51 ^{**}	0,006 ^{**}	7,5 ^{ns}	5,3 ^{**}	117,3 ^{**}	0,5 ^{**}	380 ^{**}	0,02 ^{**}	0,2 ^{**}
Erro	16	0,0002	0,2	0,00006	0,07	0,04	0,2	0,03	43	0,002	0,03
CV (%)		22	26,2	5,2	15	18	14,3	10,8	10,2	6,7	11,7
Média geral		0,06	1,7	0,1	1,8	1	3,4	1,8	64	0,6	1,5

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. ns Não significativo. FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação; PA: parte aérea; R: raiz.

B IV - Massa Seca da Parte Aérea (MSPA), Massa Seca da Raiz (MSR), Massa Seca Total (MST) e teor de óleo (Óleo) de plantas de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle e submetidas a estresse por Cd (7,5 mmol L⁻¹), Cu (15 mmol L⁻¹) e Zn (75 mmol L⁻¹) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio			
		MSPA	MSR	MST	Óleo
Tratamentos	3	128,5 ^{**}	3,7 ^{**}	166,2 ^{**}	0,01 ^{**}
Erro	16	23,8	0,1	27,3	0,0008
CV (%)		12,4	6,4	11,6	14
Média geral		39,2	5,9	45	0,2

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação; PA: parte aérea; R: raiz.

APÊNDICE C: Resumo das análises de variância referentes ao III capítulo

C I – Atividade da Peroxidase do Guaiacol nas Folhas (GPX F) e nas Raízes (GPX R); atividade da Peroxidase do Ascorbato nas Folhas (APX F) e nas Raízes (APX R); teor de Malondialdeído nas folhas (MDA F) e nas Raízes (MDA R) de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle, e submetidas a estresse por cádmio ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), cobre (15 mmol L^{-1}) e zinco (75 mmol L^{-1}) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio					
		GPX F	GPX R	APX F	APX R	MDA F	MDA R
Tratamentos	3	0,2**	22580**	0,02**	0,1**	0,006**	0,003**
Erro	16	0,004	54	0,0003	0,01	0,0002	0,0006
CV (%)		22,5	8,7	34	17	9,8	14,7
Média geral		0,3	84,4	0,05	0,7	0,15	0,2

** Significativo ao nível de 1%. FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação; PA: parte aérea; R: raiz.

C II – Concentração de Fenólicos nas Folhas (Fen F), caules (Fen C) e nas Raízes (Fen R); concentração de Flavonoides nas Folhas (Fla F), nos caules (Fla C) e nas Raízes (Fla R), de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore em condições controle, e submetidas a estresse por cádmio ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$), cobre (15 mmol L^{-1}) e zinco (75 mmol L^{-1}) em sistema hidropônico. Feira de Santana, Bahia, 2014.

FV	GL	Quadrado Médio					
		Fen F	Fen C	Fen R	Fla F	Fla C	Fla R
Tratamentos	3	1034,3**	1819**	2,07**	0,8**	0,8**	0,01**
Erro	16	52,7	52,7	0,1	0,08	0,5	0,0007
CV (%)		17,4	9,26	20,3	5,6	10,7	18,7
Média geral		41,7	78,4	1,8	5	2,03	0,1

** Significativo ao nível de 1%. FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação; PA: parte aérea; R: raiz.

APÊNDICE D

Constituintes químicos do óleo essencial de *M. leucocephalus* (Mart. Ex Menth.) J.F.B. Pastore cultivada na Unidade Experimental Horto Florestal, Feira de Santana, Bahia, em condições controle. KI_{lit} = índice de Kovats da literatura; IK_{calc} = índice de Kovats calculado.

Composto	IK_{lit}	IK_{calc}	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %
α -pineno	939	939	t	t	t	t	t
canfeno	954	954	t	t	t	t	t
sabineno	975	977	t	0,2	t	t	t
3-octanona	979	988	t	t	t	t	t
β -mirceno	990	992	t	0,3	0,3	t	t
δ -3-careno	1011	1011	t	t	t	t	t
limoneno	1029	1029	t	t	t	t	t
menta-2,4(8)-diene	1088	1089	t	t	t	t	t
terpinoleno	1088	1097	t	t	t	t	t
óxido de limoneno, cis	1136	1135	0,8	1,3	1,1	1,0	1,0
mircenona	1149	1150	t	t	t	t	t
borneol	1169	1175	0,5	0,5	0,5	0,6	0,8
formiato de isobornila	1239	1229	21,0	28,4	19,9	15,5	15,3
acetato de bornila	1288	1285	3,2	3,4	2,5	2,0	2,1
carvacrol	1299	1298	t	t	t	t	t
β -bourboneno	1388	1392	t	t	t	t	t
β -elemeno	1390	1392	t	t	t	0,3	0,4
E-cariofileno	1419	1422	6,0	5,1	8,2	10,9	13,8
α -humuleno	1454	1456	1,3	1,1	1,7	2,3	2,9
cadina-1(6),4-diene, cis	1463	1465	t	t	t	0,5	0,4
germacreno D	1485	1482	1,9	2,0	2,9	2,7	5,5
viridifloreno	1496	1497	3,2	3,0	5,2	4,8	10,1
β -bisaboleno	1505	1508	0,7	0,6	0,9	1,0	1,2
γ -cadineno	1513	1515	1,8	1,7	1,9	2,0	1,7
cis-calameneno	1529	1524	0,4	0,3	0,3	0,4	0,5
espatulenol	1578	1579	6,8	5,8	5,6	4,3	2,9
óxido de cariofileno	1583	1584	14,8	12,8	12,2	7,6	4,4
epóxido de humuleno II	1608	1610	2,2	1,8	1,7	1,0	0,6
1,10-di-epi-cubenol	1619	1616	2,1	1,8	1,8	2,0	1,7
α -muurolol	1646	1642	8,8	7,8	7,9	8,1	7,3
α -bisabolol	1685	1687	0,6	0,4	0,4	0,4	t
Total identificados			76,0	78,3	75	67,4	72,6

APÊNDICE E

Constituintes químicos do óleo essencial de *M. leucocephalus* (Mart. Ex Menth.) J.F.B. Pastore cultivada na Unidade Experimental Horto Florestal, Feira de Santana, Bahia, sob estresse por Cd. KI_{lit} = índice de Kovats da literatura; KI_{calc} = índice de Kovats calculado.

Composto	KI_{lit}	KI_{calc}	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %
α -pineno	939	939	t	t	t	t	t
canfeno	954	954	t	t	t	t	t
sabineno	975	977	t	t	t	t	t
3-octanona	979	988	t	t	t	t	t
β -mirceno	990	992	t	t	t	t	t
δ -3-careno	1011	1011	t	t	t	t	t
limoneno	1029	1029	t	t	t	t	t
menta-2,4(8)-diene	1088	1089	t	t	t	t	t
terpinoleno	1088	1097	t	t	t	t	t
óxido de limoneno, cis	1136	1135	1,2	0,8	1,1	0,9	1,0
mircenona	1149	1150	t	t	t	t	t
borneol	1169	1175	0,8	0,6	0,6	0,6	0,5
formiato de isobornila	1239	1229	16,1	19,5	17,7	18,3	17,5
acetato de bornila	1288	1285	2,4	2,6	2,3	2,6	2,5
carvacrol	1299	1298	t	t	t	t	t
β -bourboneno	1388	1392	t	t	t	t	t
β -elemeno	1390	1392	0,3	t	t	0,3	0,2
E-cariofileno	1419	1422	13,1	9,3	12,1	11,6	10,6
α -humuleno	1454	1456	2,7	2,0	2,4	2,6	2,2
cadina-1(6),4-dieno, cis	1463	1465	0,4	0,3	0,3	0,5	0,2
germacreno D	1485	1482	5,0	3,5	4,6	4,2	3,9
viridifloreno	1496	1497	8,7	5,6	7,4	7,0	6,5
β -bisaboleno	1505	1508	1,5	1,1	1,3	1,3	1,2
γ -cadineno	1513	1515	1,8	2,2	2,2	2,4	2,3
cis-calameneno	1529	1524	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
espatulenol	1578	1579	4,0	5,0	3,8	3,6	4,9
óxido de cariofileno	1583	1584	4,5	9,5	4,3	5,5	8,2
epóxido de humuleno II	1608	1610	0,7	1,4	0,6	0,8	1,2
1,10-di-epi-cubenol	1619	1616	1,6	2,1	1,9	2,1	2,1
α -muurolol	1646	1642	7,1	9,5	8,6	9,2	9,1
α -bisabolol	1685	1687	0,3	0,4	0,3	0,3	t
Total identificados			72,6	75,8	71,9	74,3	74,6

APÊNDICE F

Constituintes químicos do óleo essencial de *M. leucocephalus* (Mart. Ex Menth.) J.F.B. Pastore cultivada na Unidade Experimental Horto Florestal, Feira de Santana, Bahia, sob estresse por Cu. KI_{lit} = índice de Kovats da literatura; KI_{calc} = índice de Kovats calculado.

Composto	KI_{lit}	KI_{calc}	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %
α -pineno	939	939	t	t	t	t	t
canfeno	954	954	t	t	t	t	t
sabineno	975	977	t	t	t	t	t
3-octanona	979	988	t	t	t	t	t
β -mirceno	990	992	t	t	t	t	t
δ -3-careno	1011	1011	t	t	t	t	t
limoneno	1029	1029	t	t	t	t	t
menta-2,4(8)-diene	1088	1089	t	t	t	t	t
terpinoleno	1088	1097	t	t	t	t	t
óxido de limoneno, cis	1136	1135	0,9	0,7	1,0	1,6	1,0
mircenona	1149	1150	t	t	t	t	t
borneol	1169	1175	0,4	0,6	0,5	0,8	0,8
formiato de isobornila	1239	1229	19,0	18,0	20,6	17,6	15,3
acetato de bornila	1288	1285	2,5	2,5	2,7	2,5	2,1
carvacrol	1299	1298	t	t	t	t	t
β -bourboneno	1388	1392	t	t	t	t	t
β -elemeno	1390	1392	t	t	0,3	0,3	0,4
E-cariofileno	1419	1422	9,1	5,6	10,0	12,9	13,8
α -humuleno	1454	1456	1,9	1,2	2,1	2,6	2,9
cadina-1(6),4-dieno, cis	1463	1465	0,3	t	0,3	0,5	0,4
germacreno D	1485	1482	3,2	1,6	3,7	4,8	5,5
viridifloreno	1496	1497	5,3	2,6	6,1	8,0	10,1
β -bisaboleno	1505	1508	1,0	0,8	1,0	1,1	1,2
γ -cadineno	1513	1515	2,0	2,0	1,9	2,0	1,7
cis-calameneno	1529	1524	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5
espatulenol	1578	1579	4,9	5,7	4,9	4,3	2,9
óxido de cariofileno	1583	1584	11,5	14,5	10,8	4,9	4,4
epóxido de humuleno II	1608	1610	1,6	1,9	1,4	0,7	0,6
1,10-di-epi-cubenol	1619	1616	2,2	2,3	1,7	1,7	1,7
α -muurolol	1646	1642	9,1	11,0	7,3	7,7	7,3
α -bisabolol	1685	1687	0,4	0,6	0,3	0,3	t
Total identificados			75,7	71,9	77	74,7	72,6

APÊNDICE G

Constituintes químicos do óleo essencial de *M. leucocephalus* (Mart. Ex Menth.) J.F.B. Pastore cultivada na Unidade Experimental Horto Florestal, Feira de Santana, Bahia, sob estresse por Zn. KI_{lit} = índice de Kovats da literatura; KI_{calc} = índice de Kovats calculado.

Composto	KI_{lit}	KI_{calc}	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %
α -pineno	939	939	t	t	t	t	t
canfeno	954	954	t	t	t	t	t
sabineno	975	977	t	t	t	t	t
3-octanona	979	988	t	t	t	t	t
β -mirceno	990	992	t	t	t	t	t
δ -3-careno	1011	1011	t	t	t	t	t
limoneno	1029	1029	t	t	t	t	t
menta-2,4(8)-diene	1088	1089	t	t	t	t	t
terpinoleno	1088	1097	t	t	t	t	t
óxido de limoneno, cis	1136	1135	1,0	1,1	1,1	0,9	1,4
mircenona	1149	1150	t	t	t	t	t
borneol	1169	1175	0,4	0,6	0,2	0,6	0,5
formiato de isobornila	1239	1229	20,2	18,5	17,1	21,5	18,8
acetato de bornila	1288	1285	3,0	2,4	3,0	3,9	3,4
carvacrol	1299	1298	t	t	t	t	t
β -bourboneno	1388	1392	t	t	t	t	t
β -elemeno	1390	1392	0,2	0,3	0,2	t	0,3
E-cariofileno	1419	1422	10,9	13,3	13,0	6,8	11,2
α -humuleno	1454	1456	2,4	2,8	2,8	1,4	2,3
cadina-1(6),4-dieno, cis	1463	1465	0,3	0,4	0,3	0,2	0,4
germacreno D	1485	1482	4,0	5,2	3,7	2,2	3,6
viridifloreno	1496	1497	6,3	7,7	6,0	3,2	6,2
β -bisaboleno	1505	1508	1,1	1,2	1,3	0,7	1,1
γ -cadineno	1513	1515	2,1	2,0	2,0	1,8	2,1
cis-calameneno	1529	1524	0,4	0,4	0,4	0,3	0,5
espatulenol	1578	1579	5,2	4,3	5,7	5,5	4,4
óxido de cariofileno	1583	1584	8,6	5,1	7,9	13,2	6,5
epóxido de humuleno II	1608	1610	1,3	0,7	1,0	1,9	1,0
1,10-di-epi-cubenol	1619	1616	2,1	1,2	1,9	2,1	2,0
α -muurolol	1646	1642	8,4	7,2	8,8	10,1	9,2
α -bisabolol	1685	1687	0,3	0,3	0,4	0,5	0,3
Total identificados			78,2	74,7	76,8	76,8	75,2