UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA VEGETAL

Dissertação

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE ERVA-BALEEIRA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE

Lissane Borges Valério Rodrigues

Pelotas, 2016

Lissane Borges Valério Rodrigues

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE ERVA-BALEEIRA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano do Amarante
Coorientadores: Drª Eugenia Jacira Bolacel
Dr. Márcio Mariot
Dr. Junior Borella

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R696p Rodrigues, Lissane Borges Valério

Propagação vegetativa e parâmetros fisiológicos de erva-baleeira sob diferentes condições de luminosidade / Lissane Borges Valério Rodrigues ; Luciano do Amarante, orientador ; Eugenia Jacira Bolacel, Márcio Mariot, coorientadores. — Pelotas, 2016.

67 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Plantas medicinais. 2. Tela fotoconversora. 3. Ácido indolbutírico. 4. Óleo. 5. Estaquia. I. Amarante, Luciano do, orient. II. Bolacel, Eugenia Jacira, coorient. III. Mariot, Márcio, coorient. IV. Título.

CDD : 581.634

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Ao meu avô Dirley Lino Valério (*in memorian*) e
a minha mãe Gislaine Borges Valério, com
imenso amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a todos os seres de Luz, pela vida, força, esperança e principalmente por me ajudarem a acreditar em dias melhores.

A Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudo, pois sem ela seria muito difícil concluir essa etapa.

Aos meus familiares e amigos por me darem apoio em todos os momentos e acreditarem que conseguiria. Um agradecimento especial a minha mãe, que sempre abdicou da sua vida pessoal e profissional por mim... muito obrigada mãe, minha dívida contigo será eterna.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano do Amarante pela orientação, amizade e ensinamentos, tanto no âmbito profissional, como no pessoal.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e da Fisiologia Vegetal pelo convívio.

Aos amigos e colegas de curso e de laboratório, pela convivência diária, pela ajuda nos experimentos, por me escutarem e pelo apoio.

Aos professores, funcionários e alunos do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça – CAVG - IFSUL por toda a ajuda, vocês foram incansáveis.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

RESUMO

RODRIGUES, Lissane Borges Valério. **Propagação vegetativa e parâmetros fisiológicos de erva-baleeira sob diferentes condições de luminosidade.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

As plantas medicinais têm sido utilizadas para o tratamento paliativo ou curativo de diversas doenças desde os primórdios da humanidade. Portanto, selecionar métodos para propagar e conservar essas espécies é imprescindível. Neste contexto, se insere a espécie medicinal e nativa do Brasil, *Varronia curassavica* Jacq. conhecida popularmente como erva-baleeira, utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, antiartrítica e analgésica, sendo também utilizada como fonte de princípio ativo para o medicamento Acheflan. Esse trabalho teve como objetivos avaliar a propagação por estaquia na presença de ácido indolbutírico (AIB) e o crescimento e parâmetros fisiológicos de plantas de *Varronia curassavica* Jacq. cultivadas sob duas condições de luminosidade (pleno sol e 75% de sombreamento com tela de coloração azul) por um período de 45 dias. Os resultados obtidos permitem concluir que a propagação vegetativa de *Varronia curassavica* Jacq. a partir de estacas caulinares retiradas de ramos apicais jovens é otimizada com o uso de AIB, aumentando o número de estacas enraizadas e melhorando o desenvolvimento radicular. As diferentes condições de luminosidade influenciaram as plantas tanto em relação ao crescimento quanto em relação às variáveis bioquímicas analisadas. Nas plantas mantidas sob sombreamento foram observados menor acúmulo de massa seca de raiz e parte aérea e maior área foliar. Foram observados ainda maiores teores de pigmentos fotossintéticos, clorofilas e carotenoides, maior assimilação líquida de CO_2 e condutância estomática, porém as taxas de transpiração foram maiores causando uma menor eficiência do uso da água. O sombreamento causou também menores teores de açúcares solúveis, nitrato, aminoácidos e atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes. Esses efeitos nos metabólitos primários levaram a uma redução nos teores de compostos fenólicos em folhas e raízes e no rendimento do óleo essencial obtido das folhas. Os resultados

apresentados permitem concluir que a espécie em questão apresenta alta plasticidade em relação às condições de luminosidade a que foi submetida.

Palavras chave: plantas medicinais, tela fotoconversora, ácido indolbutírico, óleo, estaquia.

ABSTRACT

RODRIGUES, Lissane Borges Valério. **Vegetative propagation and physiological parameters of** *Varronia curassavica* **under different light conditions.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Medicinal plants have been used for the palliative or curative treatment of various diseases since the earliest days of mankind. Therefore, selecting methods to propagate and conserve these species is imperative. In this context, the medicinal and Brazilian native species *Varronia curassavica* Jacq., popularly known as erva-baleeira, used in popular medicine as anti-inflammatory, antiarthritic and analgesic, and also used as source of active principle for the drug Acheflan. The aim of this study was to evaluate the propagation using cuttings treated with indolbutyric acid (IBA) and the physiological parameters of *Varronia curassavica* Jacq. plants, cultivated during 45 days under two conditions of light (full sun and 75% shading with blue net). The results obtained allow to conclude that the vegetative propagation of *Varronia curassavica* Jacq. from stem cuttings taken from young apical branches is optimized with IBA, increasing the number of rooted cuttings and improving root development. The different luminosity conditions influenced the plants both in relation to the growth and in relation to the analyzed biochemical variables. In the shaded plants, reductions in the dry mass accumulation of root and shoot were observed and an increase in the leaf area. Also, increases in photosynthetic pigments contents, chlorophyll and carotenoid, and a higher net CO_2 assimilation rate and stomatal conductance were observed. Transpiration rates were higher in shaded plants causing a lower efficiency of water use. Shading reduced soluble sugars, nitrate, amino acids and nitrate reductase activity in leaves and roots. These effects on the primary metabolites led to a reduction in the phenolic compounds content in leaves and roots and in the yield of the essential oil obtained from the leaves. Results demonstrate that the species presents high plasticity in relation to the conditions of luminosity that it was submitted.

Key words: medicinal plants, shading net, oil, indolbutyric acid, cutting.

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1. Planta matriz de *Varronia curassavica* Jacq. em estádio reprodutivo.....15

Capítulo I

Figura 1. Estacas caulinares retiradas da planta matriz de *Varronia curassavica* Jacq.....21

Figura 2. Estacas de *Varronia curassavica* Jacq. 90 dias após tratamento com de 500 mg L^{-1} de AIB 22

Figura 3. Enraizamento (A); NMR- número médio de raízes (B), CMMR - comprimento médio de raízes (C), NMF - número médio de folhas (D), NB: número de brotações (E), TB - tamanho das brotações (F) de estacas de erva-baleeira submetidas a diferentes concentrações de ácido indol butírico (AIB).. 26

Capítulo II

Figura 1. Plantas de erva-baleeira com três meses de idade recém transferidas para vasos de polietileno de 3L, em casa de vegetação.....31

Figura 2. Estrutura montada para obter as condições de luminosidade para o experimento (pleno sol e sombrite azul 75%)..... 32

Figura 3. Avaliação do índice de clorofila (Chl), o índice de flavonoides (Flv), o índice de antocianinas e o índice de balanço do nitrogênio (NBI) com auxílio do clorofilômetro em plantas de erva-baleeira aos 15 dias de sombreamento.....32

Figura 4. Avaliação de trocas gasosas com IRGA aos 45 dias de sombreamento das plantas de erva-baleeira.....34

Figura 5. Esquema de extração de aminoácidos solúveis totais, nitrato e açúcares solúveis totais (AST) em folhas e raízes.....38

Figura 6. Parâmetros de crescimento e vigor de plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S)..... 41

Figura 7. Parâmetros de crescimento em plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S).....43

Figura 8. Índices de nitrogênio, clorofila, flavonoides e antocianinas em plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S). 45

Figura 9. Temperatura, precipitação e radiação solar durante o período de cultivo de plantas de erva-baleeira sob pleno sol (PS) e sombreamento (S).....47

Figura 10. Teores de pigmentos fotossintéticos em plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S).....49

Figura 11. Trocas gasosas em folhas de erva-baleeira crescidas a pleno sol e sombreamento. A – Taxa de assimilação líquida (*A*); B – Condutância estomática (g_s); C – Concentração intercelular de CO_2 (C_i); D – Taxa de transpiração (*E*); E – Eficiência de carboxilação da Rubisco; F – Eficiência no uso da água (EUA). PS: pleno sol; S: sombreamento.....51

Figura 12. Açúcares solúveis totais (AST) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S).....52

Figura 13. Atividade da nitrato redutase (NR) e teores de nitrato em folhas (A, C) e raízes (B, D) em plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S).....53

Figura 14. Teor de proteína total e aminoácidos solúveis totais em folhas (A, C) e raízes (B, D) de plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S).....53

Figura 15. Fenóis totais em folhas e raízes de plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S).....54

Figura 16. Rendimento de óleo essencial (B extraído de folhas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S).....56

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL 13

CAPÍTULO I 18

PROPAGAÇAO POR ESTAQUIA DE ERVA-BALEEIRA (*Varronia curassavica Jacq.)* SOB INFLUÊNCIA DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO 19

1. INTRODUÇÃO 19

2. MATERIAL E MÉTODOS 20

2.1. Material vegetal, condições de cultivo e tratamentos empregados 20

2.2. Variáveis analisadas, tratamentos empregados e delineamento experimental 21

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 22

4. CONCLUSÃO 26

CAPÍTULO II 27

PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE PLANTAS ERVA-BALEEIRA (*Varronia curassavica* Jacq.) CULTIVADAS SOBRE DUAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE 28

1. INTRODUÇÃO 28

2. MATERIAL E MÉTODOS 31

2.1. Tratamentos empregados e delineamento experimental 31

2.2. Métodos analíticos 35

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40

4. CONCLUSÃO 57

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas com fins medicinais vêm sendo amplamente utilizadas para tratamento, cura ou prevenção de doenças e constitui uma das mais antigas práticas terapêuticas utilizadas pelas populações humanas (VEIGA JR et al., 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como planta medicinal todo e qualquer vegetal que possui substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos sintéticos.

O Brasil apresenta grande biodiversidade, porém, das cerca de 55.000 espécies de plantas, há relatos de investigação de apenas 0,4% da flora (BRASIL, 2012 apud GURIB-FAKIM 2006). As estimativas atuais relatam que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos derivam diretamente ou indiretamente de plantas medicinais, por meio da aplicação de tecnologias modernas juntamente com o conhecimento tradicional (BRASIL, 2012).

Mesmo com essa vasta biodiversidade, o Brasil tem hoje apenas um fitoterápico baseado na flora brasileira, no qual todas as fases de desenvolvimento ocorreram em território nacional e, dos fitoterápicos registrados na Anvisa, uma pequena parte é oriunda de espécies nativas, o que demonstra uma maior necessidade de investimentos em pesquisas com espécies nativas (BRASIL, 2012 apud MIOTO 2010).

Segundo Vieira (2009), alguns fatores podem comprometer o uso de plantas medicinais para propósitos farmacêuticos e cita a heterogeneidade dos indivíduos, devido à variabilidade genética e bioquímica, e a dificuldade de propagação de algumas espécies. Assim, torna-se necessária a realização de estudos nos âmbitos farmacológico, terapêutico e agronômico, para o cultivo em escala comercial e a conservação destas espécies.

As plantas medicinais têm contribuído para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através dos seus metabólitos secundários. Essas substâncias são conhecidas pela forma como atuam no organismo (direta ou

indiretamente) inibindo ou ativando importantes alvos moleculares e celulares. (CALIXTO, 2005).

Dentre os fatores que regulam a biogênese de metabólitos secundários em plantas, destacam-se os estímulos bióticos e abióticos, responsáveis pela alta porcentagem de compostos voláteis e derivados fenólicos (PAVARINI, et. al, 2012).

Um problema em relação às plantas medicinais envolve o baixo percentual de metabólitos secundários produzidos, além dos teores dos compostos com atividade de interesse serem ainda menores. As pesquisas relacionadas a plantas medicinais buscam não apenas maximizar o conteúdo de metabólitos secundários, mas também avaliar a variação de constituintes de interesse farmacêutico (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A espécie *Varronia curassavica* Jacq. (Boraginaceae) [sinonímias: *Cordia verbenaceae* DC. ou *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schults] é uma planta medicinal, de hábito perene e arbustivo com folhas de até 12 cm de comprimento, geralmente ásperas, com odor forte e persistente. As inflorescências surgem nas extremidades dos ramos, em forma de espigas curvadas para baixo, com flores brancas e miúdas. Os frutos, quando maduros, são vermelhos e medem aproximadamente 0,4 cm (Figura 1). Essa espécie ocorre em uma grande área do Brasil, principalmente na região costeira. Pode ser encontrada também em áreas abertas de pastagens, beira de estradas e terrenos baldios (LORENZI e MATOS, 2008).

Conhecida popularmente como erva-baleeira, erva-balieira, maria-preta, maria-milagrosa e salicina, é utilizada principalmente como anti-inflamatória, antirreumática, antimicrobiana, antiartrítica, analgésica, tônica e antiulcerogênica (MICHIELIN et al. 2009).

Essa planta medicinal e aromática é nativa do Brasil e possui importância econômica relevante, devido ao óleo essencial presente em suas folhas. Este apresenta atividade anti-inflamatória e é utilizado como matéria prima do primeiro medicamento fitoterápico totalmente desenvolvido no Brasil a partir de uma planta nativa, cujo ingrediente ativo é α-humuleno, obtido exclusivamente do óleo essencial e indicado para o tratamento de tendinite crônica e dores miofasciais (QUISPE-CONDORI et al., 2008). Estudos fitoquímicos da parte

aérea de *V. curassavica* identificaram a presença de monoterpenos (CARVALHO JR. et al., 2004), triterpenos e flavonas (LINS et al., 1990).

Além disso, a planta possui outras importantes ações como, por exemplo, atividade contra o mosquito *Aedes aegypti* e atividade inibitória em bactérias gram-positivas, sendo também utilizada no controle cultural da broca dos citrus, como planta armadilha, para o inseto *Cratosomus flavofasciatus* (MICHIELIN et al., 2009). Possui ainda propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-alérgica e anti-tumoral (PARISOTTO et al., 2012).

Figura 1. Planta de *Varronia curassavica* Jacq. em estádio reprodutivo. (Fonte: Lissane Valério, 2015).

A propagação dessa espécie é feita por sementes, porém as plantas podem apresentar alterações na produção e no teor de óleos essenciais devido principalmente à variabilidade genética. A propagação vegetativa por meio da estaquia nesse caso entra como uma técnica viável de reprodução para manter as características genéticas das matrizes originais (FACHINELLO et al., 2005). A estaquia pode também ser utilizada para fins comerciais e auxiliar no resgate e conservação de recursos genéticos e naturais (DIAS et al., 2012).

As auxinas constituem a classe de hormônios vegetais mais conhecida, tendo como principal característica induzir o alongamento celular. Com o intuito

de melhorar esse processo, o uso de hormônios vegetais entram como uma opção que visa auxiliar e até mesmo acelerar o desenvolvimento das plantas.

Segundo Campos et al. (2008), a utilização de hormônios vegetais ou reguladores vegetais influencia diretamente na resposta das plantas, ou seja, cada órgão vai responder de uma forma e as respostas vão depender da espécie, do estádio de desenvolvimento da planta, da concentração do hormônio, entre outros fatores ambientais. Os reguladores atuam nos processos de desenvolvimento e crescimento de órgãos e ou tecidos vegetais.

O AIB (ácido indolbutírico) é uma auxina sintética que apresenta maior estabilidade e menor solubilidade que a auxina endógena o ácido indolacético (AIA), e por isso é considerada um dos melhores intensificadores do enraizamento (TAIZ e ZEIGER, 2013).

O óleo essencial de *V. curassavica* é constituído principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos. Podendo citar entre eles, o α-humuleno, o α-pineno, o aloaromadendreno, entre outros (De CARVALHO JÚNIOR et. al., 2004). Em 2004, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância e Saúde) concedeu à empresa farmacêutica Aché Laboratórios Farmacêuticos, a aprovação do registro do primeiro anti-inflamatório tópico feito através do óleo essencial de uma planta medicinal brasileira. Esse medicamento entrou no mercado no primeiro semestre de 2005 e tem como principio ativo o sesquiterpeno α-humuleno (GILBERT e FAVORETO, 2012). As folhas frescas de erva-baleeira produzem 0,23% (v/w) de óleo essencial, apresentando como principais componentes o α-pineno (29,69%), trans-cariofileno (25,27%), aloaromadendreno (9,99%) e alfa-humuleno (4,64%) (CARVALHO Jr. et al., 2004).

Alguns fatores ambientais como a disponibilidade de água, de luz e de nutrientes, temperatura e radiação ultravioleta, influenciam não apenas o crescimento de plantas medicinais, mas também o conteúdo ou proporções relativas dos metabólitos secundários, podendo potencializar a produção de compostos de interesse (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

A resposta da planta às diferentes condições de intensidade luminosa é importante para determinar o seu potencial de crescimento e ocorrência e, também para avaliar a sua capacidade competitiva em diferentes condições ambientais (DIAS-FILHO, 1997).

Além disso, a qualidade (diferentes comprimentos de onda) e intensidade (fluxo de fótons) da luz, por sua vez, podem influenciar a quantidade e a composição de metabólitos secundários (LIU et al., 2002), constituindo uma ferramenta importante para a indução da síntese de compostos bioativos de interesse ou aumentar a biomassa, fonte desses metabólitos.

O efeito do controle do espectro de luz, com o emprego de malhas coloridas sobre o crescimento de plantas medicinais, produção e composição de metabólitos secundários, tem sido explorado em diferentes espécies como alfavaca (*Ocimum gratissimum* L) (MARTINS et al., 2008), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (SOUZA et al. 2014) e mil-folhas (*Achillea millefolium* L.) (PINTO et al., 2014), mostrando resultados contrastantes e variáveis entre as espécies.

Considerando as informações disponíveis sobre a propagação vegetativa e o impacto do espectro de luz sobre o crescimento e o metabolismo desta espécie, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a propagação vegetativa e o efeito de duas condições de luminosidade sobre os parâmetros fisiológicos em plantas de *Varronia curassavica*.

CAPÍTULO I

PROPAGAÇAO POR ESTAQUIA DE ERVA-BALEEIRA (*Varronia curassavica Jacq.)* SOB INFLUÊNCIA DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO

1. INTRODUÇÃO

A espécie erva-baleeira pertence à família Boraginaceae que contém aproximadamente 100 gêneros e mais de 2.000 espécies amplamente distribuídas, sendo esta encontrada em toda a costa brasileira, desde a região nordeste até a região sul do país (LORENZI; MATOS, 2008). Está presente em listas oficiais do Ministério da Saúde no Brasil e é utilizada na preparação de fitoterápicos e também drogas industrializadas (Carvalho et al., 2008; Renisus, 2009).

Essa planta apresenta dentre suas inúmeras propriedades, a anti-inflamatória, que é conferida pelo alfa-humuleno, constituinte do seu óleo essencial. Esse princípio ativo é à base do primeiro medicamento brasileiro, totalmente fabricado e desenvolvido no Brasil, o Acheflan.

A erva-baleeira é propagada principalmente por meio de sementes, porém esse processo é demorado e gera grande variabilidade em relação à produção de metabólitos o que dificulta o plantio comercial. Desta forma a propagação vegetativa através de estacas é uma técnica de multiplicação que propicia maior viabilidade econômica principalmente para o plantio comercial, pois gera menor custo e mantém a uniformidade dos compostos de interesse. (MENDES et al. 2014).

A propagação vegetativa e o enraizamento de plantas por estaquia são influenciados pelas concentrações endógenas e exógenas de auxinas. O uso de auxinas exógenas pode estimular a mudança e diferenciação dos tecidos e assim promover a iniciação radicular (FERRI, 1997; PASQUAL et al., 2001).

As auxinas constituem a classe de hormônios vegetais mais conhecida, tendo como principal característica induzir o alongamento celular. O AIB (ácido indolbutírico) é uma auxina sintética que apresenta maior estabilidade e menor solubilidade que a auxina endógena o ácido indolacético (AIA), e por isso é

considerada um dos melhores intensificadores do enraizamento (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Com o intuito de buscar novas informações sobre a propagação vegetativa de *V. curassavica* por estaquia, o objetivo desse trabalho foi avaliar o enraizamento de estacas caulinares desta espécie tratadas com diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) via imersão rápida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal, condições de cultivo e tratamentos empregados

O cultivo do material vegetal e a condução do experimento foram realizados na área experimental do Campus Pelotas – Visconde da Graça (CaVG) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-rio-grandense (IFSUL).

As estacas de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) foram obtidas de uma planta matriz de três anos de idade, que se encontra no Setor de Floricultura do CaVG, identificada taxonomicamente e cujas exsicatas foram depositadas no herbário PEL, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas/UFPEL sob o número 26.661.

Foram coletadas estacas caulinares apicais de aproximadamente 10 cm, com pelo menos quatro gemas, e retiradas as folhas, com exceção das presentes nas extremidades, as quais foram cortadas ao meio. Todas as estacas foram retiradas de ápices dos ramos apicais jovens e cortadas em bisel (a planta encontrava-se em estádio vegetativo – junho de 2015). Em seguida, foi realizada a limpeza fitossanitária do material em hipoclorito de sódio a 0,25% durante 15 minutos. Após, as estacas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, separadas e transferidas para béqueres plásticos com capacidade para 500 mL com suas extremidades basais imersas em soluções aquosas de ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de: 0, 500, 1.000 e 2.000 mg L^{-1} durante o tempo de 10 segundos (Figura 1). As estacas foram imediatamente colocadas em tubetes plásticos com capacidade para 290 mL, preenchidas com substrato 1:1 (areia lavada previamente e vermiculita média) e cultivadas em estufa

durante o período de 90 dias. As estacas foram irrigadas por aspersão durante 15 min., três vezes ao dia, e mantidas livres de plantas invasoras, as quais foram removidas manualmente.

Figura 1. Estacas caulinares retiradas da planta matriz de *Varronia curassavica* Jacq. sendo submetidas às diferentes concentrações de AIB. (Fonte: Lissane Valério, 2015.)

2.2. Variáveis analisadas, tratamentos empregados e delineamento experimental

Após o período de 90 dias, as estacas foram retiradas dos tubetes sendo manualmente removido o substrato das raízes e em seguida cuidadosamente lavadas em água corrente. Os parâmetros avaliados foram: número médio de raízes por estaca enraizada (NMR), comprimento médio da maior raiz (CMMR), porcentagem de enraizamento (PE), número de brotações (NB), tamanho das brotações (TB) e número médio de folhas por estaca enraizada (NMF) (Figura. 2).

Figura 2. Estacas de *Varronia curassavica* Jacq. 90 dias após tratamento com diferentes concentrações de AIB . (Fonte: Lissane Valério, 2015.)

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (0, 500, 1.000 e 2.000 mg L^{-1} de AIB) e oito repetições por tratamento. A unidade experimental foi constituída de 10 estacas, totalizando 80 estacas por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo os dados de porcentagem de enraizamento previamente transformados em arc sen da raiz quadrada de x/100. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A análise estatística foi realizada com o auxilio do programa estatístico The SAS System (SAS, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O enraizamento das estacas de erva-baleeira foi estimulado pelo tratamento com ácido indolbutírico (AIB), aumentado de aproximadamente 20%, na ausência de hormônio para valores próximos a 70% na presença de AIB. A concentração de 500 mg L^{-1} foi suficiente para desencadear essa resposta, não

sendo observada diferença significativa nas concentrações mais elevadas de hormônio (Figura 3A).

Resultados obtidos por Lameira et al. (1997a), com enraizamento de estacas de erva-baleeira utilizando AIB (com adição de ácido bórico e sacarose), e imersas por 24 horas nas concentrações de 0, 250, 500 e 750 mg L^{-1} , verificaram que a concentração de 250 mg L^{-1} proporcionou o maior percentual de enraizamento, (68%) e maior número de raízes, enquanto que na ausência de AIB, o enraizamento foi de 18%. Os melhores resultados de enraizamento foram obtidos nesse experimento com metade da concentração de AIB utilizada em nosso trabalho (500 mg L^{-1}), o que pode estar relacionado com o maior tempo de imersão das estacas nas soluções com AIB, além da adição de sacarose e ácido bórico, que podem ter contribuído para a obtenção de porcentagens de enraizamento equivalentes com menores concentrações de hormônio. Mendes et al. (2014), testaram AIB e ANA (ácido naftaleno acético), nas concentrações de 0, 500, 1.000, 2.000, 3.000 e 4.000 e demonstraram que o regulador vegetal ideal para o enraizamento dessa espécie é o AIB nas concentrações acima de 1.000 mg L^{-1} e concluíram que a utilização de AIB resultou em menor porcentagem de mortalidade de estacas. Já o ANA em concentração acima de 500 mg L^{-1} , apresentou maior número de estacas mortas. Isso ocorreu provavelmente devido a essa auxina ser mais tóxica que o AIB, devendo assim, ser utilizada em concentrações menores.

Já Pereira et al. (2016), trabalhando com estacas caulinares de erva-baleeira de aproximadamente 12 cm de comprimento e concentrações de 0, 200, 400, 600, 800 e 1.000 mg L^{-1} de AIB imersas durante o período de 10 minutos avaliaram que a dose ideal de hormônio para a sobrevivência das plantas foi de 223 mg L^{-1} , equivalendo a 72,94% de sobrevivência. No entanto não foram apresentadas informações sobre o desenvolvimento radicular e nem de parte aérea.

Mendes et al. (2014), utilizando estacas semi lenhosas de erva-baleeira imersas durante dez minutos em diferentes concentrações de AIB e ANA (0, 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 mg L^{-1}) demonstraram que o regulador vegetal ideal é o AIB em concentrações acima de 1000 mg L^{-1}, e estimaram por regressão que a concentração ideal é de 2.000 mg L^{-1}, o que equivale a 53,3% de enraizamento.

Por outro lado, concluíram que o ANA não é indicado para a indução radicial em estacas dessa espécie. Nesse trabalho além do maior tempo de imersão das estacas em AIB, a concentração desse hormônio que propiciou a maior porcentagem de enraizamento foi quatro vezes superior à utilizada em nosso trabalho, o que pode estar relacionado às características do material vegetal utilizado. Estas podem ser resultantes da interação entre fatores endógenos e exógenos. Os fatores endógenos estão relacionados com as condições fisiológicas da planta matriz, o potencial genético de enraizamento, a idade da planta ou das estacas, o tipo de estaca, a época de coleta, a sanidade da planta, o balanço hormonal e a possibilidade de oxidação de compostos fenólicos. Já os fatores externos são representados pela temperatura, a luz, a umidade, o substrato e aos condicionamentos que as estacas são submetidas (FACHINELLO et al., 2005; NIENOW et al., 2010). Fatores como a idade da planta matriz, por exemplo, podem influenciar diretamente no enraizamento, uma vez que estacas retiradas de plantas matrizes em estádio juvenil apresentam maior capacidade de apresentar raízes adventícias (FACHINELLO et al. 2005).

O número médio de raízes (NMR) e comprimento médio de raízes (CMMR) aumentaram significativamente na presença de AIB. A produção de raízes aumentou para valores superiores a duas vezes comparado a estacas não tratadas com o hormônio e o CMMR até quase duas vezes para a maior concentração de hormônio (2.000 mg L^{-1}), porém sem diferenças significativas para as demais concentrações (500 e 1.000 mg L^{-1}) (Figura 3 B e C).

Mendes et al. (2014) por outro lado, verificaram que o AIB estimulou significativamente o número e comprimento médio das três maiores raízes por estaca, sendo observado um ajuste linear entre a concentração de zero até 4.000 mg L^{-1}, essa diferença de resposta pode estar relacionada às características genéticas e fisiológicas do material vegetal.

Gontijo et al. (2003) observaram maiores valores de comprimento de raízes com o aumento da concentração de AIB, em estacas de aceroleira, sendo o maior comprimento da raiz obtido com 2800 mg L^{-1} de AIB. Já Oliveira (2001) obteve incrementos crescentes para o número de raízes por estaca e comprimento médio das raízes com concentrações crescentes de AIB, avaliando estacas de oliveira.

Em trabalho realizado por Nascimento (2012), com louro-pardo, não foi observado diferença significativa em relação à presença e ausência de AIB sobre o comprimento das raízes. Segundo Reis et al. (2000), uma melhor resposta para o comprimento e número de raízes formadas nas estacas indica que as mudas posteriormente formadas possuirão melhor desenvolvimento, uma vez que a melhor qualidade e desenvolvimento do sistema radicular possibilitará maiores chances de sobrevivência quando transplantadas para o campo. O número de raízes é uma característica interessante a ser avaliada, pois se presume que um maior número de raízes primárias deve determinar uma melhor arquitetura de sustentação, refletindo em maior sobrevivência das plantas no campo (CARNEIRO, 2013).

O número médio de folhas (NMF), número de brotações (NB) e tamanho de brotações (TB), não foram influenciados pela presença de AIB nas concentrações avaliadas (Figura 3 D, E e F), indicando que o material vegetal utilizado foi responsivo ao AIB apenas para a emissão e desenvolvimento de raízes.

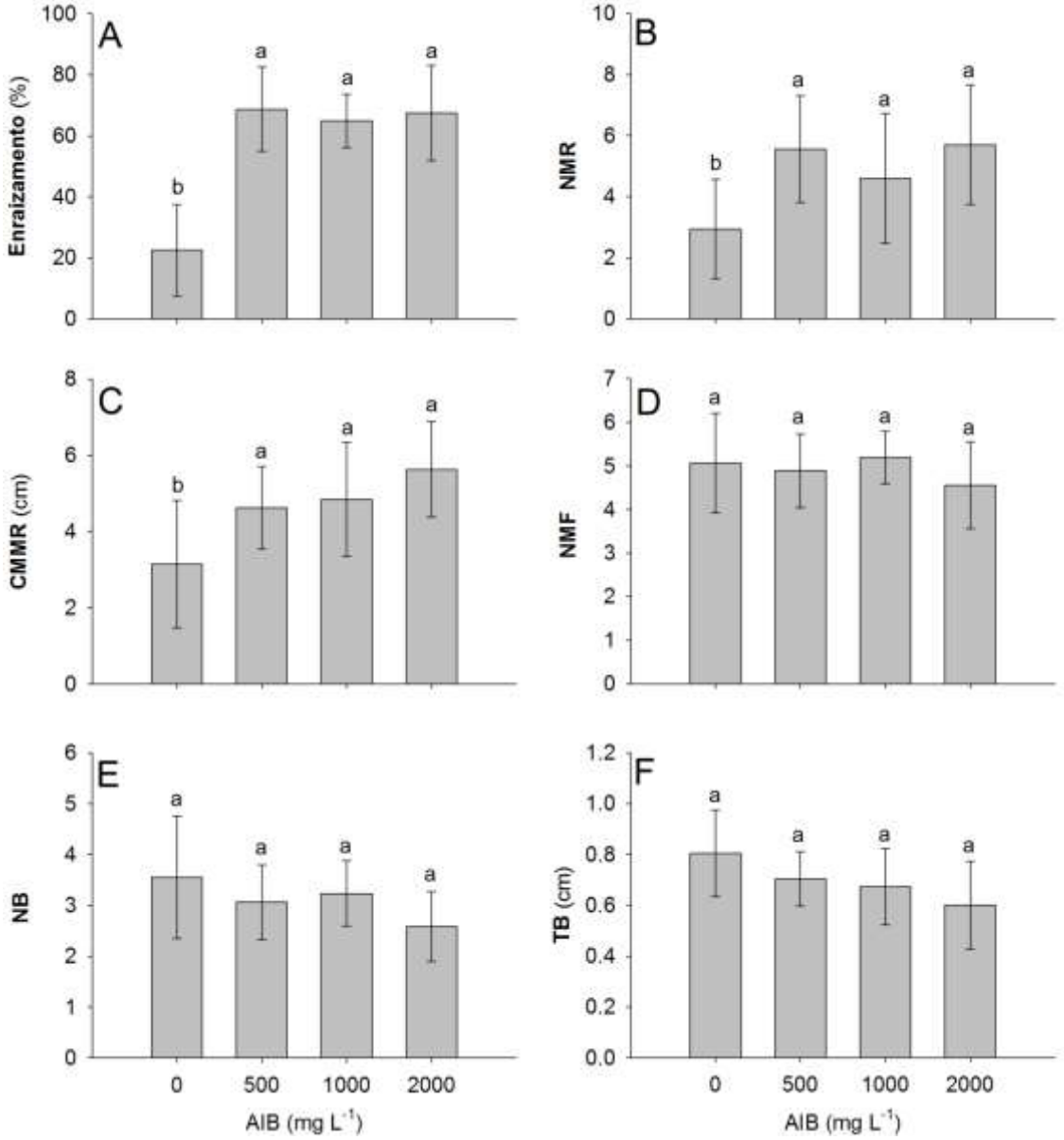

Figura 3. Enraizamento (A); NMR- número médio das raízes (B), CMMR - comprimento médio de raízes (C), NMF - número médio de folhas (D), NB: número de brotações (E), TB - tamanho das brotações (F) de estacas de erva-baleeira submetidas a diferentes concentrações de ácido indol butírico (AIB). Média ± desvio padrão seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0{,}05$). ($n = 8$).

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições experimentais testadas permitem concluir que o uso do ácido indolbutírico favorece o enraizamento de estacas apicais de *Varronia curassavica* Jacq., resultando em um melhor desenvolvimento radicular.

CAPÍTULO II

PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE PLANTAS ERVA-BALEEIRA (*Varronia curassavica* Jacq.) CULTIVADAS SOBRE DUAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE

1. INTRODUÇÃO

A erva-baleeira, *Varronia curassavica* Jacq. (sinonímias: *Cordia verbenaceae* DC. ou *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schults) é uma planta medicinal e aromática originária do Brasil, que possui importância econômica relevante, devido ao óleo essencial presente em suas folhas. Este apresenta atividade anti-inflamatória e é utilizado como matéria prima do primeiro medicamento fitoterápico totalmente desenvolvido no Brasil a partir de uma planta nativa, cujo ingrediente ativo é α-humuleno, obtido exclusivamente do óleo essencial e indicado para o tratamento de tendinite crônica e dores miofasciais (QUISPE-CONDORI et al., 2008). Além disso, a planta possui outras importantes ações como, por exemplo, atividade contra o mosquito *Aedes aegypti* e atividade inibitória em bactérias gram-positivas, sendo também utilizada no controle da broca dos citrus, como planta armadilha, para o inseto *Cratosomus flavofasciatus* (MICHIELIN et al., 2009). Possui ainda propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-alérgica e anti-tumoral (PARISOTTO et al., 2012).

A qualidade da matéria prima é determinada pela produção da matéria seca e pelo conteúdo de compostos bioativos, parâmetros resultantes, principalmente, da influência do ambiente no qual as plantas são cultivadas, e do estádio de desenvolvimento e época de coleta das plantas (GRAY et al., 2003). Assim, a importância de estudos sobre o comportamento fisiológico de espécies da flora medicinal brasileira consiste em gerar conhecimentos que possibilitem determinar condições ideais de cultivo, a fim de alcançar maiores índices de produção de matéria seca e de princípios ativos de interesse econômico e farmacológico (SOUZA et al., 2014).

A luz é um fator abiótico de fundamental importância para as plantas, atuando na regulação de seu crescimento e desenvolvimento. As respostas morfofisiológicas dos vegetais não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas também da variação em qualidade luminosa. A dinâmica do crescimento e desenvolvimento das plantas medicinais e aromáticas apresenta alterações bioquímicas e fisiológicas características de seus estádios fenológicos, capazes de modificar a elaboração de substâncias biologicamente ativas, nos aspectos qualitativos e quantitativos (TAIZ e ZEIGER, 2013).

As plantas que são expostas a mudanças nas condições de luminosidade possuem a capacidade de aclimatar-se em maior ou menor grau à nova condição. A aclimatação maximiza o ganho total de carbono, o qual pode ocorrer através de mudanças nas propriedades de assimilação das folhas, por meio de ajustes fisiológicos e alterações nas características foliares relacionadas à fotossíntese ou ainda por mudanças no padrão de alocação de biomassa em favor da parte vegetativa mais afetada pela mudança de luz (LEE et al., 2000). No entanto, a natureza da resposta morfogênica pode variar consideravelmente entre espécies de acordo com a capacidade de aclimatação e a dependência da quantidade ou qualidade da luz (LIMA et al., 2008).

A utilização de telas de sombreamento para o cultivo de plantas, além de permitir a proteção física, promove a filtragem diferencial da radiação solar, constituindo importante ferramenta para modificar a radiação incidente nas plantas, em termos de espectro e dispersão, promovendo respostas fisiológicas específicas que são reguladas pela luz (BRANT et al., 2009). A malha de coloração azul filtra as ondas na faixa do vermelho e do vermelho distante, permitindo a passagem de ondas com transmitância na região do azul-verde (400-540 nm) (SHAHAK et al., 2004; BRANT et al., 2009).

Estudos sobre as respostas de diferentes espécies de plantas medicinais em função de mudanças na intensidade e qualidade da luz, por meio da utilização de telas coloridas, sobre o crescimento, produção e composição de princípios bioativos, têm sido conduzidos com diferentes espécies medicinais, como *Achillea millefolium* L. (PINTO et al., 2014); *Mentha piperita* L. (COSTA et al., 2014); *Rosmarinus officinalis* L. (SOUZA et al., 2014), *Melissa officinalis* L. (BRANT et al., 2009; MEIRA et al., 2012), *Mikania glomerata* Sprengel (SOUZA et al., 2011) e *Ocimum selloi* Benth. (COSTA et al., 2010), sendo observadas

respostas diferenciadas entre as espécies estudadas. O emprego de malha azul produziu resultados positivos no incremento de massa seca foliar ou rendimento do óleo essencial em várias dessas espécies. Em alecrim (*Rosmarinus officinalis* L), estimulou a produção de biomassa seca de folha, em relação ao sombreamento com malha vermelha ou plantas cultivadas a pleno sol (SOUZA et al., 2014). Em plantas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), o teor de óleo essencial aumentou 142% em relação ao de plantas crescidas a pleno sol (MARTINS et al., 2008). Já em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), o estímulo da produção óleo essencial das plantas pela malha azul, foi acompanhado pelo incremento da massa seca de folhas (SOUZA et al, 2011).

No entanto, com relação à *Varronia curassavica* Jacq. há pouca informação a respeito de suas adaptações fisiológicas e bioquímicas frente a mudanças na intensidade, e sobretudo qualidade da luz, sendo relatada a influência de níveis de irradiância (20 a 100% da luz solar plena) na produção de massa seca, rendimento e composição do óleo essencial dessa espécie, demonstrando um efeito inibitório da restrição luminosa sobre o crescimento e rendimento do óleo, porém sem resultar em diminuição da massa seca foliar ou produção do principal componente do óleo essencial com interesse farmacológico, o α-humuleno (FEIJÓ et al., 2014). As respostas fisiológicas desta espécie frente a alterações na luminosidade também têm sido pouco estudadas, sobretudo em relação ao metabolismo do carbono e nitrogênio.

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar respostas adaptativas de plantas de *Varronia curassavica* Jacq. a duas condições de luminosidade: sombreamento com tela azul 75% e pleno sol, no que se refere a parâmetros fisiológicos relacionados ao crescimento, metabolismo do carbono e nitrogênio, além da produção de óleo essencial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Tratamentos empregados e delineamento experimental

As mudas de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) foram obtidas por estaquia a partir de ramos retirados de planta matriz localizada no Setor de Floricultura do Campus Pelotas - Visconde da Graça (CaVG) do IFSul. O exemplar foi identificado taxonomicamente e as exsicatas foram depositadas no Herbário PEL, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas/UFPEL, sob o número 26.661. As mudas com três meses de idade foram transferidas para vasos de polietileno de 3L contendo substrato Beifort S10-B permanecendo durante trinta dias em casa de vegetação (Figura 1). Após esse período, foram submetidas a dois níveis de sombreamento: 0% (pleno sol) e 75% (sombrite 75% azul). O sombreamento foi obtido através de colocação de tela sobre estrutura montada com o auxílio de bambus e cordas (Figura 2).

Figura 1. Plantas de erva-baleeira com três meses de idade recém transferidas para vasos de polietileno de 3 L, em casa de vegetação. (Fonte: Lissane Valério, 2015.)

Figura 2. Condições de cultivo da erva-beleeira. Esquerda, pleno sol e direita, estrutura de cultivo com sombrite azul – 75% de sombreamento) (Fonte: Lissane Valério, 2015.)

Figura 3. Aparelho clorofilômetro utilizado para análises do índice de clorofila (Chl), o índice de flavonoides (Flv), o índice de antocianinas e o índice de balanço do nitrogênio (NBI) nas plantas de erva baleeira (Fonte: Lissane Valério, 2015).

As plantas permaneceram nessas condições durante o período de 45 dias, sendo regadas manualmente conforme a necessidade. As plantas daninhas também foram retiradas manualmente conforme a necessidade. A cada 15 dias, foram avaliados a estatura, o comprimento do maior ramo, o número de ramos, número de folhas e o vigor.

O vigor das plantas foi avaliado por meio de avaliação visual, por atribuição de notas numa escala de 1 a 5, onde 1 significa baixo vigor e 5 máximo vigor. Com o auxílio de clorofilômetro (modelo Dualex FORCE-A, Orsay, France), a partir da média das leituras das duas primeiras folhas expandidas por planta (Figura 3), foram avaliados o índice de clorofila (Chl), o índice de flavonoides (Flv), o índice de antocianinas e o índice de balanço do nitrogênio (NBI). O índice de Flv foi deduzido a partir de propriedades de absorção UV de flavonoides. Esta abordagem está relacionada à técnica de fluorescência utilizando dois comprimentos de onda de excitação: no comprimento de onda de UV (375 nm), absorvidos por flavonoides, localizados principalmente na epiderme; e no comprimento de onda de referência que passa através da epiderme, sem ser absorvido antes de atingir a clorofila no mesofilo. A relação entre Chl/Flv permite a estimativa do índice de NBI (ABDALLAH, 2012).

Ao final do experimento (45 dias de tratamento) foram avaliados: área foliar, massa seca da parte aérea, de folhas e de raízes, massa fresca de folhas e de raízes, volume de raízes, área foliar específica, razão parte aérea/raiz, os teores de pigmentos fotossintetizantes (clorofilas *a* e *b*, clorofila e carotenoides totais) em folhas, razão clorofila *a*/*b*, razão clorofila total/carotenoides, atividade da enzima redutase do nitrato, concentração de aminoácidos solúveis totais, nitrato, proteínas, açúcares solúveis totais, teor de óleo essencial , em raízes e folhas e fenóis em folhas.

A taxa de assimilação líquida de CO_2 (*A*), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (Ci), taxa de transpiração (*E*), eficiência de carboxilação da Rubisco, eficiência do uso da água (EUA) foram avaliados por meio do aparelho Analisador de Fotossíntese IRGA (LI- 6400XT LI-COR) (Figura 4). Todas as avaliações foram realizadas na primeira e segunda folha expandida mais jovem, do ramo principal de cada planta no período entre as 10:00 e 11:00 utilizando como parâmetros: 380µmol mol^{-1} de CO_2 e densidade de fluxo de fótons de 500 e 1.500µmol de fótons m^{-2} s^{-1}, usando fonte de luz LI-COR 6400-02 acoplado a câmara de medição IRGA.

Figura 4. Analisador de trocas gasosas – IRGA (LI- 6400XT LI-COR). (Fonte: Lissane Valério, 2015.).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com número de repetições e unidade experimental variável, dependendo do parâmetro avaliado. Nas avaliações com o fluorômetro ao longo do período de cultivo (índice de clorofilas, índice de antocianinas, índice de flavonoides, índice de balanço de nitrogênio), o número de repetições foi igual a 6. Nas avaliações de crescimento (número de folhas, comprimento do maior ramo, número de ramos, estatura e vigor), o número de repetições foi igual a 60. Já para as trocas gasosas, metabólitos e biomoléculas (pigmentos fotossintéticos foliares, açúcares solúveis totais, aminoácidos solúveis totais, proteínas, nitrato e fenóis totais), atividade da redutase do nitrato e avaliações de crescimento (massa fresca e seca de raízes e de folhas, massa seca da parte aérea, área foliar e volume do sistema radicular) aos 45 dias de tratamento, o número de repetições correspondeu a 10, onde cada unidade experimental consistiu em uma planta. Nas determinações do rendimento do óleo essencial, o número de repetições foi igual a três, onde a unidade experimental consistiu em 30 plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e nos casos significativos, as médias pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SAS 2.0.

2.2. Métodos analíticos

2.2.1. Análise de parâmetros de crescimento

O crescimento das plantas em cada tratamento foi determinado pelo acúmulo de massa fresca e seca dos caules/ramos, folhas e raízes e os resultados expressos em g planta^{-1}. Inicialmente, as plantas recém colhidas foram separadas em parte aérea e sistema radicular, onde retirou-se cuidadosamente o substrato das raízes, sendo as partes acondicionadas em sacos plásticos em caixa de isopor com gelo. Em laboratório, as raízes foram lavadas em água corrente e secas com papel toalha, e as folhas separadas dos caules/ramos, sendo em seguida mensuradas as massas frescas de cada parte da planta. Em seguida foram determinadas a área foliar, por meio de um medidor de área foliar Li-Cor (Modelo Li-3100–Li-Cor In. NE USA) e o volume do sistema radicular, por deslocamento de água em proveta. As diferentes partes das plantas foram transferidas para sacos de papel pardo, os quais foram acondicionados em estufa de circulação de ar a 65°C até atingirem peso constante, sendo então determinada a massa seca de cada órgão. As pesagens foram realizadas em balança semi-analítica (marca Marte, modelo AS 2000C).

2.2.2. Extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes

A extração e quantificação dos pigmentos fotossintetizantes foram realizadas com base em Wellburn (1994). Foram retiradas, uma folha jovem expandida de cada unidade experimental e em seguida cortadas em pequenos segmentos, desprezando-se a nervura central. Em cada extração, foi utilizado 0,04 g de amostra fresca, a qual foi inserida em tubo de ensaio contendo 7mL de dimetilsulfóxido (DMSO) neutralizado com carbonato de cálcio 5%. Em seguida, cada tubo foi incubado em banho-maria a temperatura de 65ºC por 1 hora, ao abrigo da luz e após resfriado no escuro até atingir temperatura ambiente, para então serem realizadas as leituras das absorbâncias a 480 nm, 649 nm e 665 nm em espectrofotômetro (marca Biospectro, modelo SP-22).

Os teores de clorofila *a*, *b*, total, razão clorofila *a*/b, teores de carotenoides e razão clorofila total/carotenoides foram calculados com base nas equações:

Clorofila *a* = (12,47 x A665) - (3,62 x A649); Clorofila *b* = (25,06 x A649) - (6,5 x A665); Clorofila total = clorofila *a* + clorofila *b* e Carotenoides = (1000 x A480) - (1,29 x clorofila *a*) - (53,78 x clorofila b) / 220; e os resultados foram expressos em mg g^{-1} MF. A partir dos valores obtidos para esses pigmentos, foram calculadas a Razão clorofila *a*/*b* = clorofila *a*/clorofila *b*; Razão clorofila total/carotenoides = clorofila total/carotenoides.

2.2.3. Extração e dosagem da enzima nitrato redutase em folhas e raízes

A extração e dosagem da atividade da enzima nitrato redutase foi obtida empregando-se o ensaio *in vivo*, de acordo com UFPR (2001), em material recém-colhido: folhas jovens expandidas e em raízes da porção mediana do sistema radicular. Conforme avaliações preliminares foi estipulado o horário das 9 horas da manhã para a coleta do material.

As amostras de 0,8g de folhas e 0,6g de raízes foram lavadas com água destilada gelada, secas em papel toalha e incubadas em tubos de ensaio com 4 mL de solução tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 7,5, 100 mM contendo KNO_3 25 mM e propanol 1%) e foram infiltradas sob vácuo a 300 mmHg, durante 1 minuto, repetido por três vezes, com a finalidade de facilitar a penetração do substrato nos tecidos vegetais.

Após a infiltração, os tubos foram incubados em banho-maria a 30ºC por 30 minutos no escuro. Retirou-se um volume de 1 mL do meio de reação para tubos com 2 mL de reagente para dosagem de nitrito (sulfanilamida 1% em HCl 3 N e N-1- naftil etilenodiamina hidrocloreto 0,02%), os quais foram incubados novamente em banho-maria a 30ºC por 15 minutos. A concentração de nitrito foi determinada em espectrofotômetro (marca Biospectro, modelo SP-22) a 540 nm, comparando os valores obtidos com a curva padrão de nitrito em quantidades variando de 0 a 500 nmol de NO_2^- e a atividade da enzima foi expressa em μmol g^{-1} MF h^{-1}.

2.2.4. Extração e dosagem de aminoácidos solúveis totais, nitrato e açúcares solúveis totais, proteínas e fenóis totais em folhas e raízes

A extração de aminoácidos solúveis totais, nitrato e açúcares solúveis totais foram realizadas conforme Bieleski; Turner (1966).

Amostras de 1 g de folhas jovens expandidas de cada unidade experimental (uma planta), sem a nervura central e de raízes da porção mediana do sistema radicular, foram coletadas, lavadas com água destilada gelada, secas em papel toalha e armazenadas em freezer para posterior extração e determinação de metabólitos.

Durante a extração, as amostras foram trituradas em almofariz, utilizando N_2 líquido e posteriormente homogeneizadas pela adição de 10 mL de solução extratora M:C:W (metanol:clorofórmio:água na proporção de 12:5:3). As amostras foram deixadas em repouso por 24 horas à temperatura ambiente na ausência de luz e posteriormente centrifugadas a 600 x g durante 10 minutos em tubos de centrífuga reforçados (marca TPP). A cada 8 mL de sobrenadante obtido, foi acrescentado 2 mL de clorofórmio e 3 mL de água pura em tubos de ensaio, os quais foram centrifugados novamente a 600 x g durante 10 minutos para obter o extrato aquoso. Esse foi coletado e concentrado por evaporação em banho-maria a 37ºC por 24 horas, com a finalidade de eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio presentes (Figura 5). Os extratos foram então armazenados em tubos de eppendorf, em freezer, para posteriores análises dos teores de aminoácidos solúveis totais, nitrato e açúcares solúveis totais.

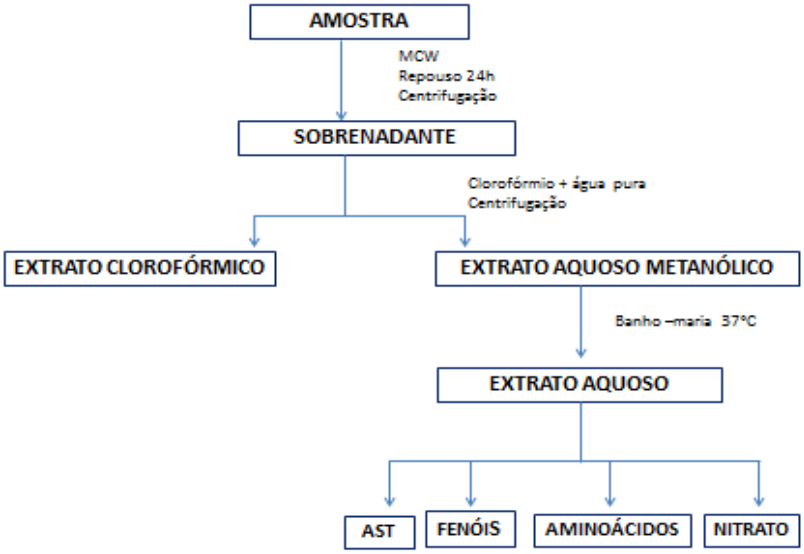

Figura 5. Esquema de extração de aminoácidos solúveis totais, nitrato, açúcares solúveis totais (AST) e fenóis totais em folhas e raízes.

A extração de proteínas de folhas e raízes foi realizada conforme Bueno (1989). O precipitado obtido no extrato MCW foi ressuspendido em 10 mL de NaOH 0,1N e homogeneizado. Após 24 horas, o extrato foi centrifugado a 600 x g por 30 min., e o sobrenadante foi coletado para posterior dosagem.Os teores de aminoácidos solúveis totais foram determinados segundo Yemm; Cocking (1955). Os extratos de folhas e raízes devidamente diluídos em água pura, em um volume final de 1 mL, em tubos de ensaio, foram acrescidos de 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M, pH 5,0, 0,2 mL de reativo de ninhidrina 5% em metilcelusolve (etermonometílico de etilenoglicol) e 1 mL de KCN 2% (v/v) em metilcelusolve (preparada a partir da solução 0,01 M de KCN em água pura). Os tubos de ensaio foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para o banho-maria a 100ºC por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados no escuro até atingir a temperatura ambiente e após foi acrescentado 1,3 mL de etanol 60%, completando o volume para 4 mL e feita a agitação dos tubos. A densidade ótica dos padrões de leucina (0-200 nmol) e das amostras, foi medida a 570 nm, sendo feitas duas repetições para cada amostra e o teor de aminoácidos solúveis totais foi expresso em µmol g^{-1} MF.

A determinação de nitrato foi executada conforme o método de Cataldo et al. (1975). O volume de 50 µL de extratos de folhas e raízes devidamente diluídos

em água pura, foi misturado a 200 μL de reagente salicílico (acido salicílico 5% em H_2SO_4 concentrado) em tubo de ensaio, seguido de agitação em vórtex. Decorridos 20 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados lentamente aos tubos 4,75 mL de NaOH 2N. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos foram agitados novamente e efetuadas as leituras de absorbância a 410 nm, das amostras, dos padrões de KNO_3 (0-500 nmol de NO_3^-) e do branco, sendo feitas duas repetições para cada amostra. O teor de nitrato foi expresso em μmol g^{-1} MF.

A dosagem de açúcares solúveis totais (AST) foi realizada com base em Graham; Smydzuk (1965). Coletou-se 1 mL de cada amostra devidamente diluída, de um branco (água) e dos padrões (10-150 μg de glicose mL^{-1}), em tubos de ensaio, mantidos em gelo. Adicionou-se 3 mL de solução de antrona (0,15% p/v em ácido sulfúrico concentrado) resfriada a cada tubo e cobriu-se imediatamente com bolinhas de vidro. Após 15 min, agitaram-se os tubos e incubou-se em banho-maria a 90ºC por 20 min. Em seguida, mantiveram-se os tubos no escuro até a atingir temperatura ambiente. Os tubos foram novamente agitados e a densidade óptica (D.O) dos padrões, branco e amostras, foram medidas em espectrofotômetro a 620 nm (marca Biospectro, modelo SP-22).

A dosagem de proteínas foi realizada conforme a metodologia de Bradfort (1976). As proteínas totais foram dosadas pelo método padrão, utilizando amostras e padrão BSA (soroalbumina bovina, fração V) em quantidades variando entre 0 e 100μg em volume de 0,1mL, acrescidos de 5,0mL de reagente de cor (Coomasie Brilliant G 250, 100mg em 50mL de etanol 95% e 100mL de H_3PO_4 85% p/v). Para raízes foi utilizado o micrométodo, com o padrão de BSA em quantidades variando de 0 a 20 μg de proteína /0,1mL, por 1mL de reagente de cor. Após a adição do reagente de cor sobre as amostras e padrões, os tubos foram agitados para posterior leitura das densidades ópticas (D.O.) a 595nm.

A quantificação de fenóis totais foi realizada em alíquotas do extrato aquoso, na qual foram acrescentados 500 μL de reagente Folin-Ciacalteau 1 N e agitado em vórtex. Após 15 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 5 mL de reagente alcalino 0,1 N (solução de carbonato de sódio e hidróxido de sódio) e agitado em vórtex. Após 60 minutos em temperatura ambiente, as leituras das amostras e dos padrões de ácido fênico (0-200 μg) foram realizadas em espectrofotômetro a 760 nm e a quantificação foi expressa em μg g^{-1} MF.

2.2.5. Extração e estimativa do rendimento do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada em amostras de aproximadamente 100g de folhas secas moídas, por meio da técnica de arraste a vapor em aparelho de Clevenger, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2000). O material vegetal foi inserido em balão volumétrico, ao qual foi acrescentado 1500 mL de água ultra pura (Milli-Q). O tempo de refluxo foi de quatro horas, contados a partir do início da fervura. Após o período de extração a parte líquida foi separada e foi adicionado 3 g de sulfato de sódio anidro por 15 minutos em agitação, para remover toda a parte líquida, separando bem o óleo. O rendimento em porcentual do óleo essencial foi calculado com base na massa seca e na quantidade (mL) de óleo obtido durante a hidrodestilação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de erva-baleeira submetidas a duas condições de luminosidade, pleno sol e sombreamento com malha azul mostraram diferentes respostas frente às análises realizadas (Figs. 1-8). A malha azul muda o espectro da qualidade da luz que chega até as plantas, reduzindo as ondas na faixa do vermelho e vermelho-distante e acrescentando as ondas azuis (Larcher, 2004). O fluxo de radiação pontual transmitida pela malha azul e registrado em unidade de medida instantânea (μmol fótons m^{-2} s^{-1}), obtido em um dia de sol sem nuvens, e convertido em porcentagem de atenuação, correspondeu a um valor de aproximadamente 66%, sendo a radiação aproximada que chega as plantas de sol de 1.500 μmol fótons m^{-2} s^{-1} e para plantas sombreadas 500 μmol fótons m^{-2} s^{-1} (dados não mostrados obtidos a partir de medidor fotossintético – IRGA).

A redução da intensidade de luz durante o cultivo de erva-baleeira promoveu efeitos diferenciados entre as plantas mantidas sob pleno sol ou sombreadas durante o período avaliado. O número de folhas e da estatura, aumentaram nas plantas cultivadas sob sol pleno, resultando em aumento significativo desses parâmetros em relação às plantas sombreadas aos 30 dias de avaliação (Figs. 1A e 1B). Já o número de ramos e o comprimento do maior ramo, foram significativamente maiores nas plantas a pleno sol, apenas aos 45

dias de cultivo (Figs. 1C e 1D). O vigor, no entanto, não foi alterado mesmo no grupo de plantas crescidas a pleno sol (Fig. 1E).

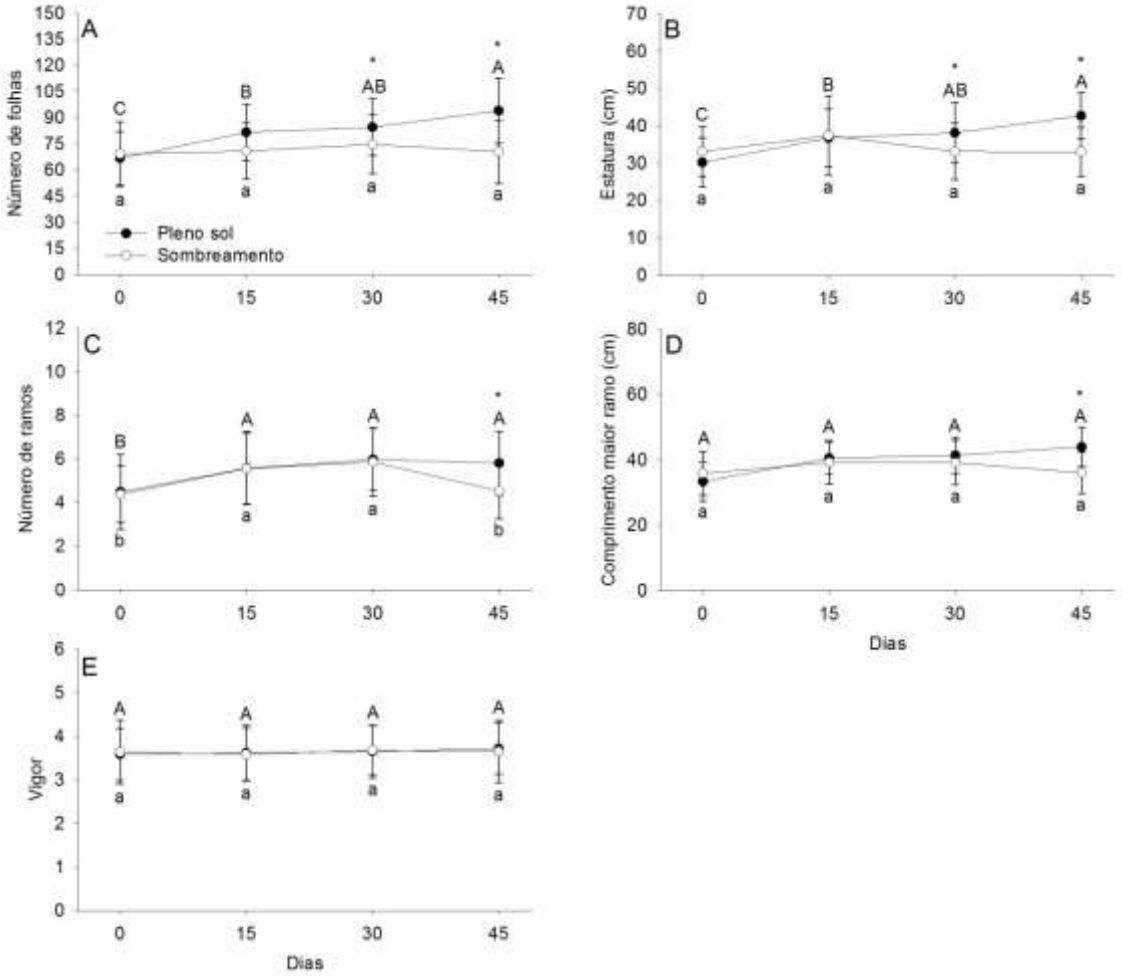

Figura 1. Parâmetros de crescimento e vigor de plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sob sombreamento (S). Letras iguais minúsculas (comparando os dias para sombreamento) ou letras iguais maiúsculas (comparando os dias para pleno sol) não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade. Asterisco (*) indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre pleno sol e sombreamento dentro de cada período (dia). Valores representam a média ± DP. (n=60).

A diminuição da intensidade de luz influenciou o crescimento das plantas de *V. curassavica* também resultando aos 45 dias de sombreamento em menor desenvolvimento do sistema radicular, demonstrado pela redução significativa do volume, massa fresca e seca de raízes (Figura 2 E, H, I) e da massa seca da parte aérea (Figura 2 D).

A massa fresca e seca de folhas, diferentemente das demais variáveis, não foram alteradas pelo sombreamento (Figura 2 C, G), porém a área foliar

aumentou em aproximadamente 50 %, resultando em acréscimo de quase 70 % da área foliar específica (Figura 2 A, B).

Esses dados representam um comportamento clássico de plantas expostas a sombra comparada às plantas em sol pleno, uma vez que, plantas sombreadas aumentam consideravelmente o tamanho foliar como mecanismo de maior interceptação e absorção de luz para o processo fotossintético, enquanto plantas sob pleno sol, menor tamanho das folhas são suficientes para absorção da energia necessária a fotossíntese, além disso, menor tamanho evita que a folha receba alta radiação que possa levar ao processo de fotoinibição e consequentemente danos aos fotossistemas responsáveis pela absorção e transferência de energia no cloroplasto (LARCHER, 1995).

A área foliar específica expressa à razão entre área foliar e a massa seca da folha e é considerada um importante fator do ponto de vista fisiológico por descrever a alocação da biomassa da folha por unidade de área, refletindo o *trade-off* (permuta) entre a rápida produção de biomassa e a eficiente conservação de nutrientes (POORTER; GARNIER, 1999).

A maior redução da massa seca de raízes (Fig 2E), em torno de 50 %, em relação à da parte aérea, 20 (Fig 2D), resultou em grande aumento da razão parte aérea/raiz (Fig. 2F), o que sugere maior alocação do carbono fixado pela fotossíntese para o desenvolvimento da parte área.

Os resultados para os diferentes parâmetros de crescimento neste experimento, avaliados aos 45 dias de tratamento, são corroborados pelos encontrados por Feijó et al. (2014), em que plantas de *Varronia curassavica* com um mês de idade, propagadas por sementes, foram cultivadas por 90 dias sob os níveis de irradiância de 20, 50, 70 e 100% do sol pleno. O acúmulo de biomassa seca total e de raízes mostraram um ajuste quadrático com máxima produção a 54% e 75% de irradiância proporcionada pelo sol pleno, respectivamente, ao passo que a biomassa seca do caule decresceu linearmente com o aumento da irradiância. Apesar da massa seca de folhas não ter sido afetada, mesmo nos níveis de irradiância mais elevados, a área foliar foi severamente reduzida, acompanhada por um aumento da razão massa seca foliar/área foliar. Resultados diferenciados foram obtidos por Paulilo et al. (2010), que não observaram diferenças no acúmulo de massa seca de parte aérea, folhas ou raízes, para níveis de irradiância de 20, 70 e 100%, porém houve um

aumento significativo de área foliar no nível mais baixo de irradiância. É interessante observar que neste experimento, as plantas foram cultivadas durante 210 dias, onde o nível mais baixo de irradiância (20 % da luz solar plena) correspondeu a 360 μmol m^{-2} s^{-1} de um dia típico de verão, ao meio dia, um valor bem inferior ao estudado em nossas condições experimentais, o que permite inferir sobre a grande adaptabilidade dessa espécie à variação da intensidade de luz.

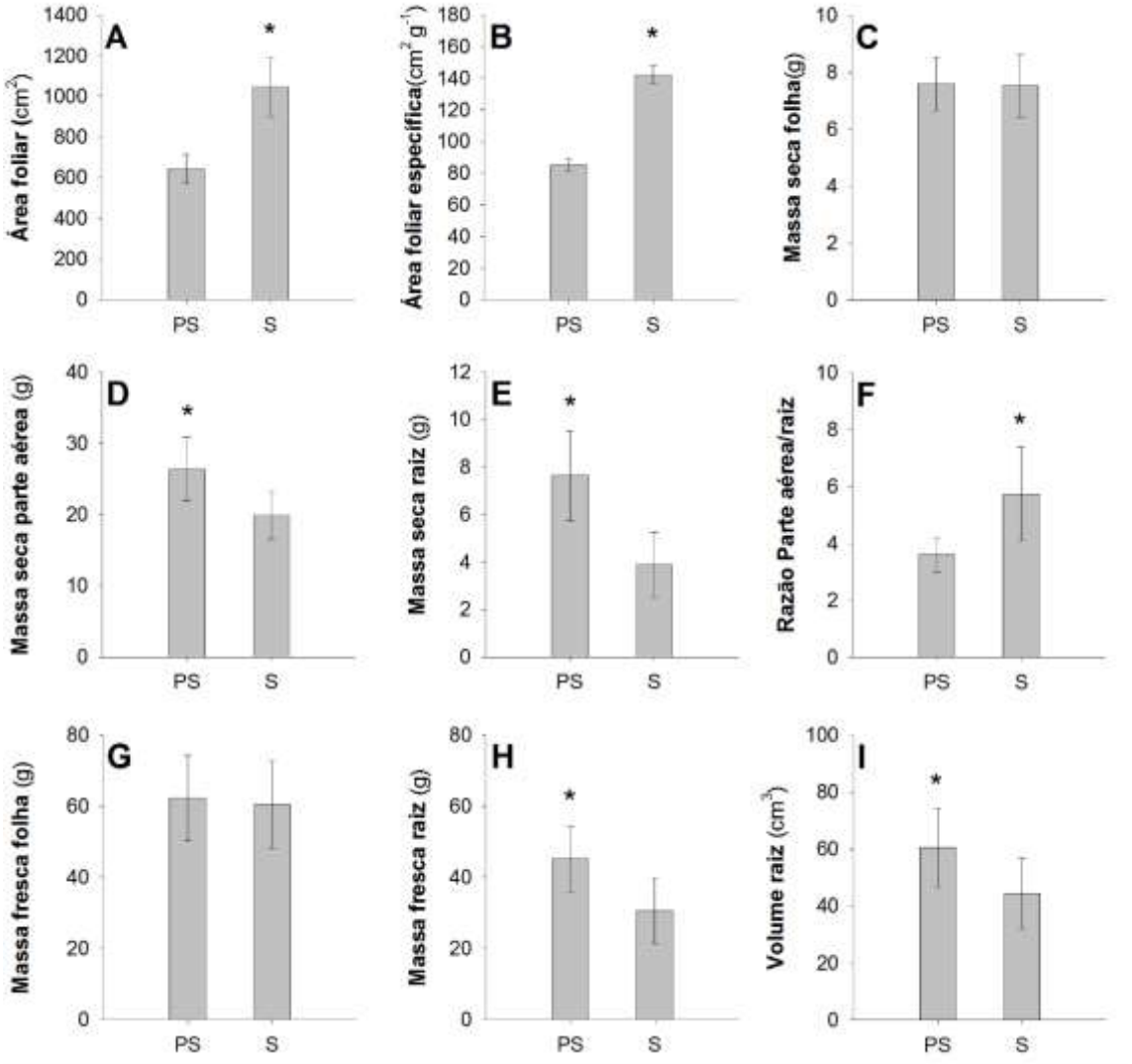

Figura 2. Parâmetros de crescimento em plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S). Média ± desvio padrão seguidas por asterisco (*) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (n = 10).

Em menta (*Mentha arvensis* L.), a maior quantidade de massa seca foliar acumulada daquelas mantidas a pleno sol pode ter ocorrido devido ao aumento da espessura foliar (diminuição da área foliar específica) que, normalmente,

ocorre em folhas sob alta disponibilidade luminosa, como recurso de proteção aos pigmentos fotossintéticos, conforme relatado por Scalon et al. (2001). Resultado semelhante foi encontrado por Ventrella e Ming (2000), que observaram decréscimo na produção de massa seca foliar de plantas de erva-cidreira (*Lippia alba*) com o aumento do nível de sombreamento. Diferentemente, neste trabalho, as plantas de erva-baleeira crescidas sombreadas, priorizaram a alocação de carbono para o aumento da superfície foliar (Figs. 2A e 2B), pois mesmo apresentando um menor número de folhas que as plantas crescidas a pleno sol (Fig. 1A), apresentaram massa equivalente às plantas crescidas a pleno sol (Fig. 2C), resultando em um efeito compensatório para a maximizar o aproveitamento de luz para a fotossíntese.

O aumento da área foliar decorre de ampliação da superfície fotossintetizante na planta, visando à máxima absorção luminosa (SCALON et al., 2001). Segundo Nobel (1991) folhas sombreadas geralmente podem apresentar um aumento na área superficial de 20% a 80% maior do que folhas crescidas ao sol. A redução no nível de radiação incidente induz as plantas a investirem maior proporção dos seus recursos no crescimento em altura e em área foliar. O aumento na área foliar total pode decorrer tanto de aumento na expansão celular quanto de aumento no número de divisões celulares ao longo da lâmina foliar (FRIEND; POMEROY, 1970).

Os índices de clorofilas e de flavonoides, mensurados ao longo do período de sombreamento na primeira e segunda folhas expandidas mais jovens, mostraram resultados diferenciados entre as plantas sombreadas e não-sombreadas. Nas plantas sombreadas o índice de clorofila e de flavonoides mantiveram-se estáveis ao longo do período avaliado. Nas plantas mantidas sob pleno sol, o índice de clorofila decresceu, sendo essa diminuição significativa aos 30 dias de exposição ao sol e o de flavonoides aumentou com o período de exposição às condições naturais de luz, sendo significativamente elevados já aos 15 dias de avaliação (Fig. 3).

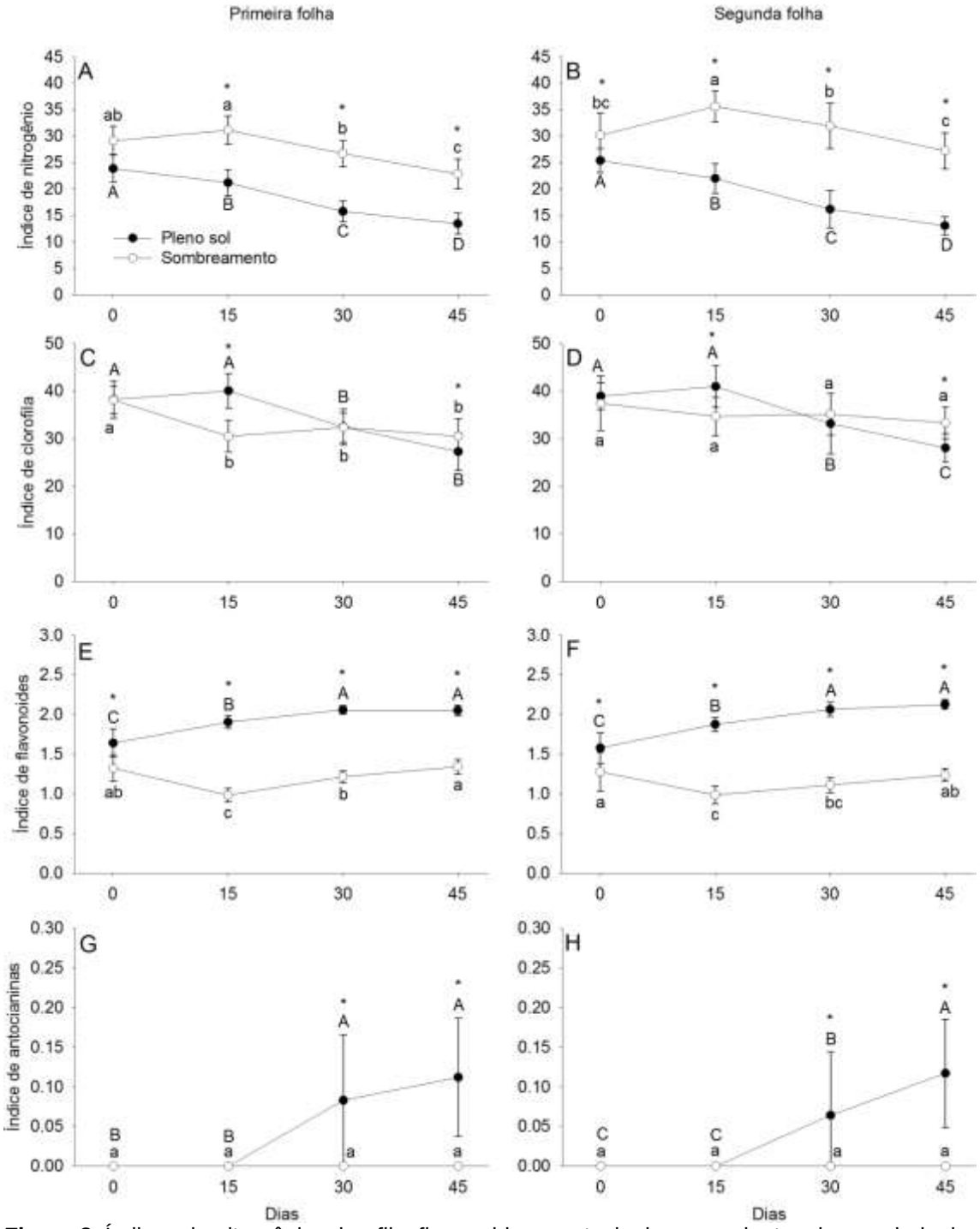

Figura 3. Índices de nitrogênio, clorofila, flavonoides e antocianinas em plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sob sombreamento (S). Média ± desvio padrão seguidas por asterisco (*) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0{,}05$). ($n = 6$).

A relação inversa observada entre o índice de clorofila e o de flavonoides, resultou em um decréscimo do índice de balanço de nitrogênio ao longo do período de avaliação, sendo este valor superior nas plantas sombreadas (Figs. 3A e 3B). O índice de flavonoides é deduzido a partir de propriedades de absorção UV dos flavonoides. Para obter esses resultados, a abordagem é a

técnica de fluorescência, a qual utiliza dois comprimentos de onda de excitação: no comprimento de onda de UV (375 nm), absorvido por flavonoides, localizados principalmente na epiderme; e no comprimento de onda de referência que passa através da epiderme, sem ser absorvido antes de atingir a clorofila no mesofilo. A relação entre clorofilas/flavonoides permite a estimativa do índice de balanço de nitrogênio (ABDALLAH, 2012). Em relação ao índice de antocianinas, foi possível mensurar com o clorofilômetro, valores significativos aos 30 e 45 dias de tratamento, nas plantas mantidas a pleno sol apenas (Fig. 3G).

Esses resultados indicam, possivelmente, uma resposta de fotoproteção das folhas à radiação solar, considerando que os períodos que antecederam essas avaliações, destacaram-se dos demais quanto ao tempo e intensidade de exposição das plantas à energia de radiação incidente (Fig. 4). Ainda, a grande oscilação térmica, observada pela variação das temperaturas máximas e mínimas, pode ter contribuído para essa resposta. Os flavonoides são considerados potentes antioxidantes naturais, isso se deve aos grupos hidroxila ligados à estrutura do seu anel aromático. Segundo Almeida (2006) a capacidade antioxidante dos flavonoides geralmente aumenta com o aumento dos grupos hidroxila resultantes do favorecimento na deslocalização de elétrons nos núcleos aromáticos, permitindo assim a estabilidade do radical. As antocianinas (Figs. 3 G-H) são compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides e constituem grupos de pigmentos responsáveis por grande parte das cores em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas (TEIXEIRA, 2008). De acordo com Hartmann et al. (2005) e Ubi et al. (2006), os valores das antocianinas podem variar significativamente em relação ao caráter genético e ao meio onde estão sendo cultivadas, isto porque, genes específicos são influenciados pela radiação ultravioleta e em altas temperaturas passam a agir.

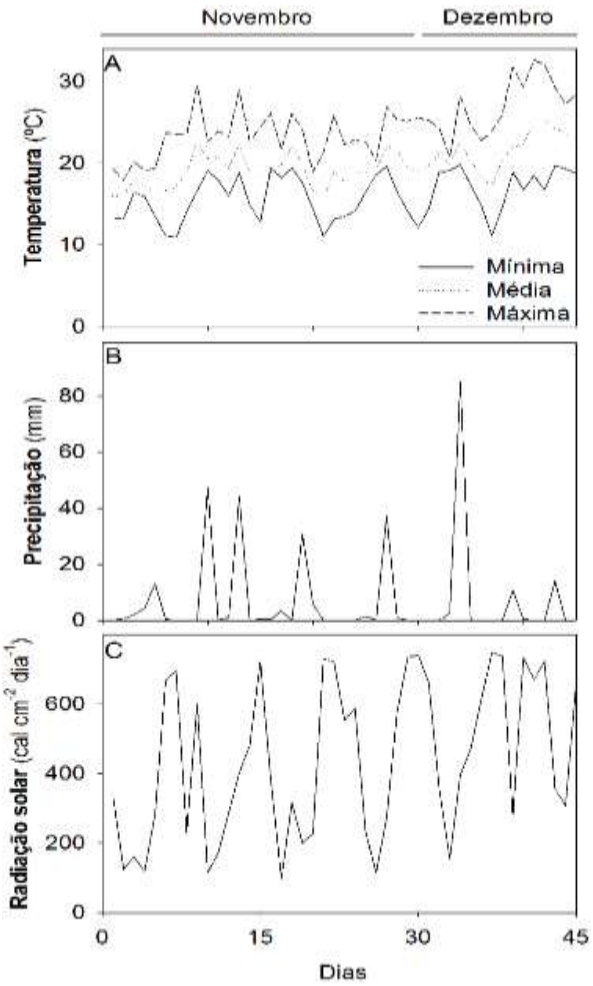

Figura 4. Temperatura, precipitação e radiação solar durante o período de cultivo de plantas de erva-baleeira.

Um dos fatores ligados à eficiência fotossintética de plantas e consequentemente ao crescimento e adaptabilidade a diversos ambientes é a clorofila, presente em todos os vegetais verdes (TAIZ e ZEIGER, 2013). Segundo Alvarenga et al. (2003) a luz é um fator controlador no acúmulo de massa seca na planta, contribuindo assim para o crescimento e desenvolvimento vegetal. Já a plasticidade das plantas está relacionada com a capacidade de adaptação frente a diferentes situações de luminosidade (radiação solar), resultando em modificações no aparato fotossintético promovendo o acúmulo eficiente de massa seca e o crescimento. Lopes et al. (1986) afirmam que a redução da intensidade luminosa pode diminuir o processo fotossintético e com isso, a produção de biomassa seca.

A exposição das plantas de erva baleeira por 45 dias ao sombreamento, resultou em diferença significativa no teor de pigmentos fotossintéticos, em

relação às plantas mantidas a pleno sol. O teor de clorofila *a*, *b* e total e carotenoides totais de plantas sombreadas foram superiores aos encontrados em plantas não sombreadas (Figs. 5A-E), o que contribuiu à grande adaptabilidade das plantas submetidas à restrição luminosa. He et al. (1996) observaram que os teores de clorofila são mais elevados em folhas sombreadas, aumentando dessa forma a capacidade de absorção de luz em diferentes comprimentos de onda nos picos da fotossíntese.

A maior razão clorofila total/carotenoides (Fig 5F) e menor razão clorofila *a*/clorofila *b* nas plantas sombreadas (Fig. 5D), indicam o investimento na biossíntese dos pigmentos coletores de luz acessórios, clorofila *a* e carotenoides, para otimizar as reações que envolvem os centros de reação dos fotossistemas, favorecendo o aproveitamento da energia luminosa e sua conversão em energia química, necessária para a fixação e redução do CO_2 em carboidratos.

A menor razão clorofila *a*/clorofila *b* pode estar relacionada ao fato de que a maior proporção de clorofila *b* em ambientes sombreados está associado à degradação mais lenta desse pigmento em comparação com a clorofila *a* (ENGEL; POGGIANI, 1991). O aumento da proporção da clorofila b em plantas com baixa luminosidade é uma resposta importante, pois a clorofila *b* é responsável pela captação de energia de outros comprimentos de onda transferindo-a para a clorofila *a*, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese (SCALON et al., 2002). Essa resposta pode ser explicada como uma forma adaptativa da planta, fazendo com que a captação de luz seja mais eficiente em condições de baixa intensidade luminosa.

Os teores de carotenoides tendem a aumentar com o aumento da intensidade luminosa (FERRAZ; SILVA, 2001) e podem ser utilizados para estimar o potencial fotossintético das plantas devido à sua ligação direta com a absorção e com a transferência de energia luminosa, assim como ao crescimento e a adaptação a diversos ambientes (REGO; POSSAMAI, 2006).

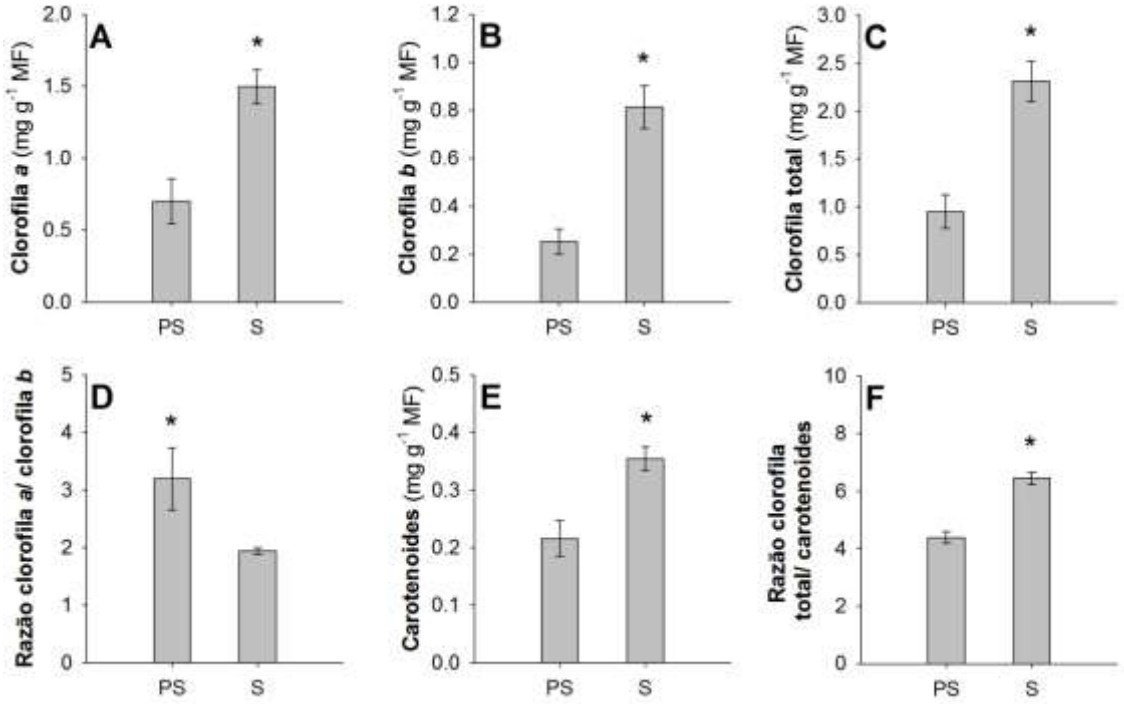

Figura 5. Teores de pigmentos fotossintéticos em plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sob sombreamento (S). Média ± desvio padrão seguidas por asterisco (*) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). (n = 10).

As taxas de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e taxa de transpiração (E) foram significativamente superiores nas plantas sombreadas em comparação às plantas mantidas a pleno sol, nas duas densidades de fluxo de fótons fotossintética (DFFF), 500 µmol m^{-2} s^{-1} e 1500 µmol m^{-2} s^{-1} avaliadas (Fig. 6A-D). Essas variáveis, avaliadas em conjunto, podem indicar um elevado grau de adaptação das plantas ao decréscimo da luminosidade, onde as duas intensidades de radiação fotossinteticamente ativas testadas foram capazes de estimular as trocas gasosas, possivelmente por meio de maior captação de CO_2 pelo processo fotossintético e condutância estomática, permitindo maior entrada de CO_2 pelos estômatos, em ambos os casos. A eficiência de carboxilação da Rubisco foi significativamente maior nas plantas sombreadas quando avaliada sob uma DFFF de 1500 µmol m^{-2} s^{-1}, não diferindo das plantas mantidas a pleno sol na DFFF de 500 µmol m^{-2} s^{-1} (Fig. 6 E), sugerindo também a otimização dos mecanismos que poderiam levar a maior captação e redução do CO_2 fotossintético. Um dos fatores que pode estar relacionado, é o elevado teor de pigmentos fotossintéticos nesse grupo de plantas, tanto clorofila *a* e *b* e

carotenoides (Figs. 5 A, B e E), o que pode ter facilitado a captação da radiação fotossintéticamente ativa e consequente canalização da energia luminosa para síntese em energia química, necessária para ativação da Rubisco e conversão do CO_2 a carboidratos no Ciclo de Calvin-Benson. Além desse fator, a maior condutância estomática deve ter contribuído para o maior fluxo de CO_2, aumentando consequenteente Ci e disponibilizando maior quantidade de substrato para a Rubisco atuar como carboxilase.

A eficiência do uso da água (EUA), no entanto, foi significativamente inferior nas plantas sombreadas, independente da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos avaliado, demonstrando que a elevada taxa de transpiração nas plantas sombreadas contribuiram para uma menor relação A/E (Figs. 6 A, E e F), e, portanto uma maior necessidade de uso de água em relação à quantidade de CO_2 fixado, o que pode pelo menos explicar em parte, o menor crescimento das plantas sombreadas (Figs. 1 e 2).

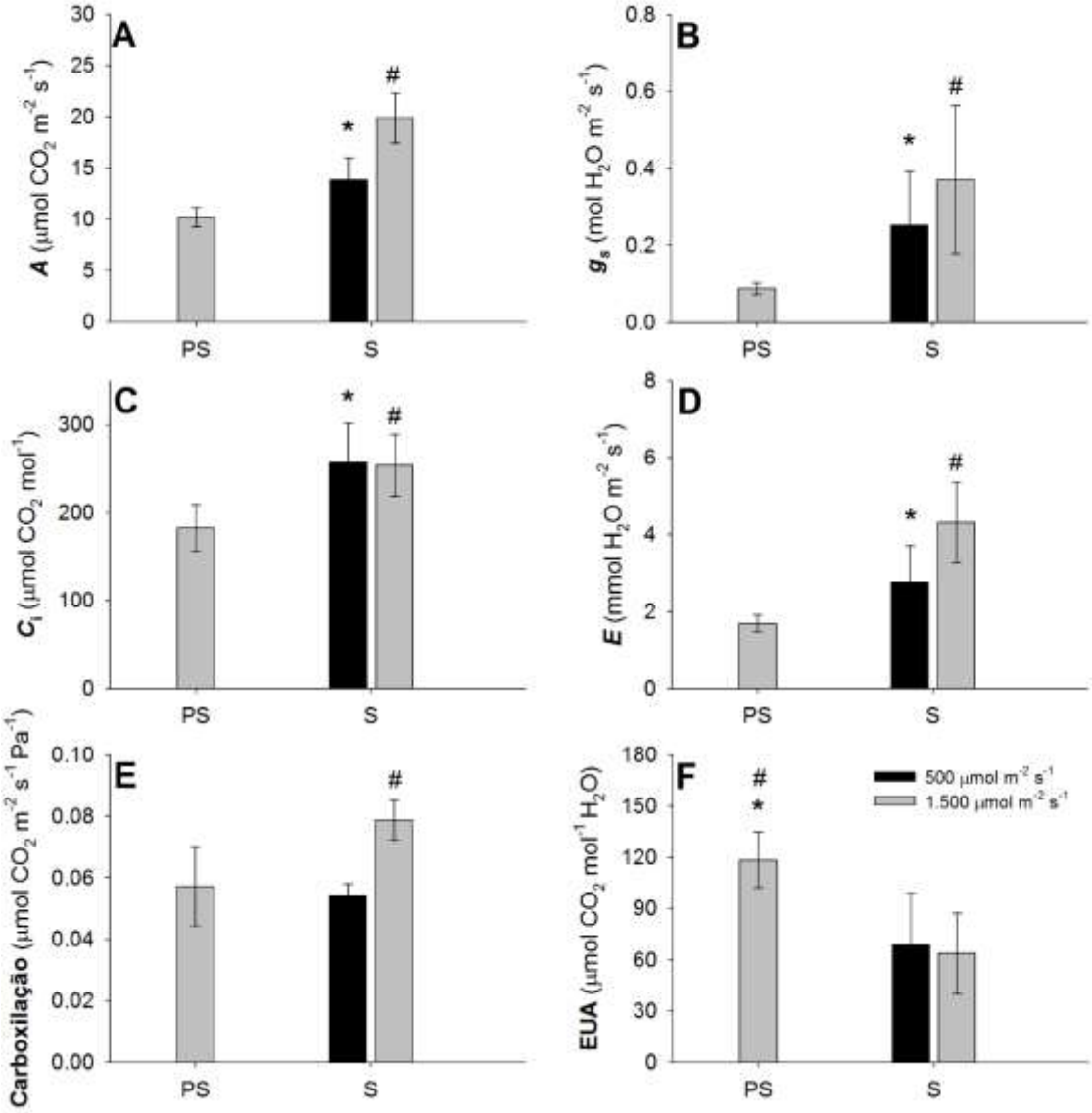

Figura 6. Trocas gasosas em folhas de erva-baleeira crescidas a pleno sol e sob sombreamento. A – Taxa de assimilação líquida (*A*); B – Condutância estomática (g_s); C – Concentração intercelular de CO_2 (C_i); D – Taxa de transpiração (*E*); E – Eficiência de carboxilação da Rubisco; F – Eficiência no uso da água (EUA). PS: pleno sol; S: sombreamento. Média ± desvio padrão seguidas asterisco (*) ou cardinal (#) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para pleno sol e sombreamento (500 µmol m^{-2} s^{-1}) e para pleno sol e sombreamento (1500 µmol m^{-2} s^{-1}), respectivamente. (n = 10).

As diferenças observadas no crescimento das plantas de erva-baleeira (Figs. 1 e 2) nas condições de sombreamento e pleno sol são provavelmente resultantes de diferenças no metabolismo do carbono e do nitrogênio influenciado pela luz, o que pode ser constatado pelas grandes diferenças nas oncentrações de açúcares solúveis totais em folhas e raízes (Figs. 7 A e B), chegando a reduções em torno de 4,5 e 3 vezes os valores aos encontrados em folhas das plantas crescidas em pleno sol. As grandes reduções nas

concentrações de nitrato, aminoácidos totais e proteínas, assim como a atividade da enzima redutase do nitrato, em raízes e folhas das plantas sombreadas, evidenciaram o efeito restritivo da luz tanto no transporte quanto na redução e assimilação do nitrogênio (Figs. 8 e 9).

Dados evidenciam que as plantas a pleno sol apresentaram uma maior utilização de energia fotossintéticamente ativa, levando a uma maior fixação do carbono atmosférico em carboidratos, como evidenciado pelo aumento dos açucares solúveis totais. Os carboidratos, sendo essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas, possibilitaram maior acúmulo de massa em plantas a pleno sol, uma vez que representam fontes de esqueletos de carbono para o crescimento, sendo produzidos na parte aérea e transportados para as raízes (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O aumento da produção de carboidratos também evidencia maior acúmulo de carbono para a síntese de aminoácidos, a partir da absorção de assimilação de nitrato via nitrato redutase, que, por sua vez, reduz nitrato a nitrito e este pela ação da enzima nitrito redutase em amônio que é incorporado em aminoácidos (Fig 8). A maior disponibilidade de aminoácidos em plantas de sol em comparação a plantas de sombreadas pode ser utilizada para a síntese de proteínas (Fig. 9) que desempenham importantes funções no metabolismo dos vegetais (BUCHANAN et al., 2015).

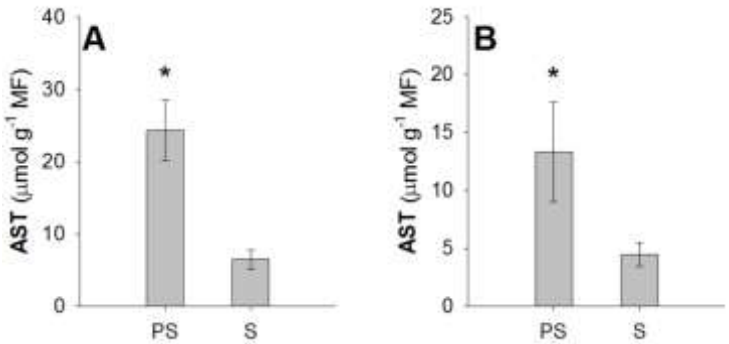

Figura 7. Açúcares solúveis totais (AST) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sob sombreamento (S). Média ± desvio padrão seguidas por asterisco (*) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ($n = 10$).

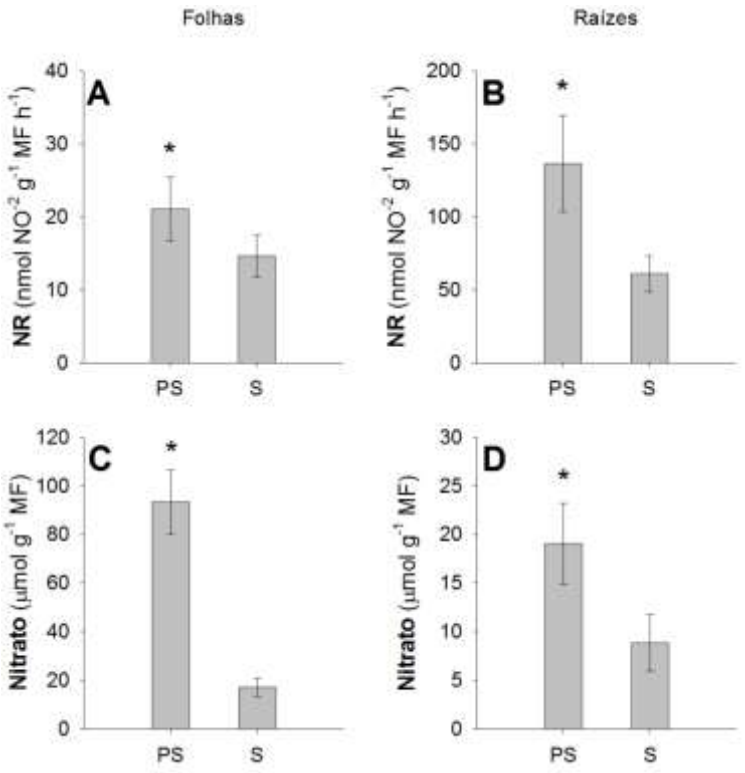

Figura 8. Atividade da nitrato redutase (NR) e teores de nitrato em folhas (A, C) e raízes (B, D) em plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sob sombreamento (S). Média ± desvio padrão seguidas por asterisco (*) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0{,}05$). ($n = 10$).

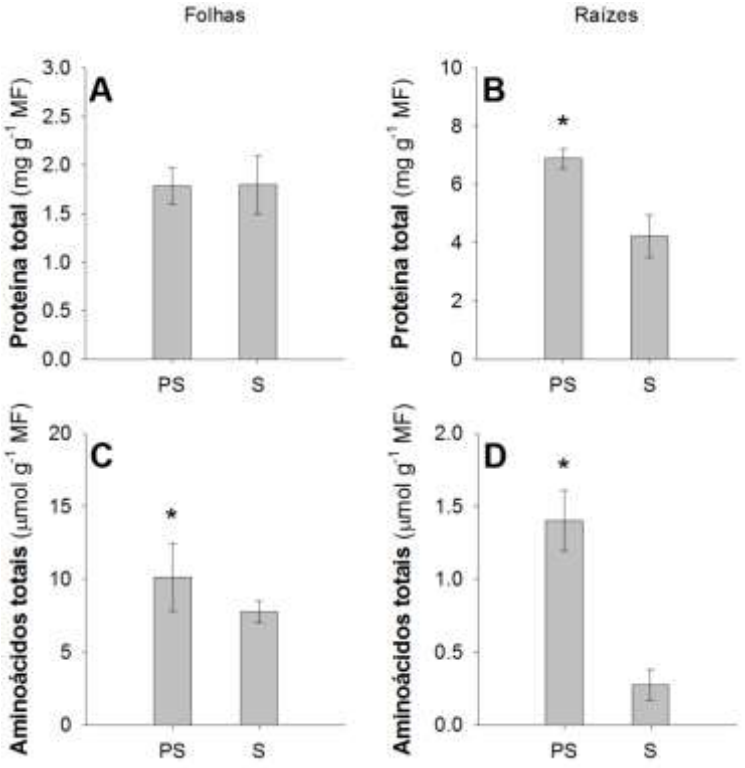

Figura 9. Teor de proteína total e aminoácidos solúveis totais em folhas (A, C) e raízes (B, D) de plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S). Média ± desvio padrão seguidas por asterisco (*) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0{,}05$). ($n = 10$).

O teor de compostos fenólicos foi influenciado significativamente pela intensidade de radiação incidente nas plantas, resultando em redução tanto em folhas, quanto em raízes (Fig. 10) desse grupo de biomoléculas nas plantas sombreadas. Esta resposta pode estar relacionada ao efeito inibitório da luz sobre a síntese dos metabólitos primários como os açúcares e aminoácidos, uma vez que a síntese de compostos aromáticos dependem da disponibilidade de esqueletos carbônicos provenientes do metabolismo de carboidratos e de aminoácidos. Izquierdo et al. (2011) ao estudarem o efeito da intensidade de luz e níveis de nitrogênio sobre a síntese de compostos fenólicos em *Cecropia peltata*, relacionaram à maior síntese de compostos fenólicos à maior intensidade de luz em que as plantas foram submetidas, o que foi relacionado à atividade da enzima fenilalanina amônia liase, enzima que catalisa a conversão do aminoácido fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico, permitindo assim, o fluxo de entrada dos metabólitos primários no metabolismo secundário, por meio da rota de síntese dos compostos fenólicos.

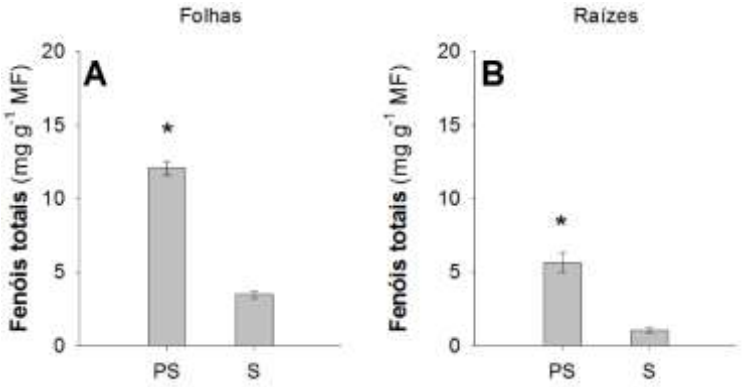

Figura 10. Fenóis totais em folhas e raízes de plantas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sob sombreamento (S). Média ± desvio padrão seguidas por asterisco (*) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ($n = 5$).

O rendimento do óleo essencial de erva-baleeira, calculado com base na massa seca foi influenciado pela luz. Uma maior porcentagem de óleo foi obtida em folhas das plantas mantidas sob sol pleno (Fig. 11), ocorrendo uma redução de aproximadamente 40% nos valores obtidos em plantas cultivadas sob restrição de luz.

Em trabalho conduzido por Feijó et al. (2014) foi demonstrado que tanto o conteúdo quanto o rendimento do óleo essencial de *Varronia curassavica* foram sensíveis à intensidade de radiação em que as plantas cresceram, mostrando uma resposta linear, ou seja, os valores aumentaram com o aumento dos níveis

de irradiância, o que corrobora com os resultados de nosso trabalho. Esta resposta foi associada ao aumento da frequência de tricomas globulares glandulares responsáveis pela síntese e armazenamento de óleo essencial nesta espécie (VENTRELLA e MARINO, 2008).

Souza et al. (2014) trabalhando com malhas vermelhas e azuis e plantas submetidas a pleno sol demonstraram em seu trabalho que as plantas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) cultivadas a pleno sol e sob malha azul apresentaram maiores valores em relação ao teor e rendimento do óleo. As plantas cultivadas em malha azul obtiveram um aumento correspondente a 116% no teor de óleo quando comparado com as plantas cultivadas sob malha vermelha. Dessa forma é possível inferir que o sombreamento com malha azul alterou o metabolismo secundário em alecrim.

Costa et al. (2014) demonstraram que o teor do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) não foi afetado pelos diferentes níveis de sombreamento (0, 30, 50 e 70%) e malhas (preta e aluminizada); já o rendimento, como é dependente do acúmulo de biomassa nas folhas, apresentou resultado similar ao observado para a biomassa seca de folhas.

O rendimento do óleo de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) apresentou um decréscimo linear nas malhas utilizadas à medida em que os níveis de sombreamento aumentaram, sendo o rendimento do óleo na malha preta o mais afetado. O rendimento máximo para essa espécie foi no tratamento a pleno sol, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho. Em plantas jovens de guaco, Souza et al (2011) obtiveram o menor teor de óleo observado em plantas cultivadas a pleno sol, quando comparadas com os tratamentos (diferentes cores de malhas). Nesse trabalho a utilização de malha azul, apresentou o maior percentual de óleo essencial. Esse fato de acordo com os autores pode ser explicado devido ao sombreamento proporcionado pela malha azul promover a ativação das rotas do metabolismo em plantas *de M. glomerata*. A maior produção de metabólitos secundários sob altos níveis de radiação solar são explicadas devido ao fato de que as reações biossintéticas são dependentes de suprimentos de esqueletos carbônicos, realizados por processos fotossintéticos e de compostos energéticos que participam da regulação dessas reações (TAIZ; ZEIGER, 2013).

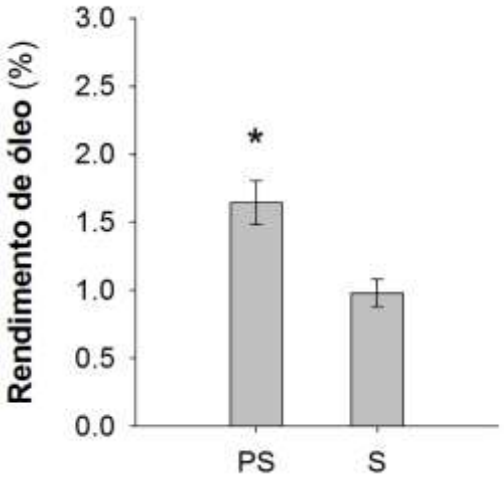

Figura 16. Rendimento de óleo essencial (extraído de folhas de erva-baleeira crescidas a pleno sol (PS) e sombreamento (S). Média ± desvio padrão seguidas por asterisco (*) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ($n = 3$).

As variações da intensidade luminosa e da temperatura no decorrer do dia podem atuar diretamente em processos primários, como fotossíntese e respiração, o que pode influenciar indiretamente a produção de metabólitos secundários e nos constituintes do óleo essencial, cuja síntese depende de produtos do metabolismo primário (PAULUS et al. 2013).

Souza et al. (2011), encontraram resultados semelhantes em relação à quantidade de massa seca (g) e o rendimento total de óleo em plantas de guaco. A intensidade luminosa é um fator que influencia tanto na concentração como na composição dos óleos essenciais. Alguns autores afirmam que o nível de sombreamento influencia diretamente no rendimento do óleo essencial. Dessa forma, Carvalho e Casali (1999) mostram que várias espécies medicinais apresentam diminuição na produção do óleo essencial, quando a radiação é menor. A radiação é um fator que pode interferir diretamente na produção e na qualidade dos óleos essenciais através da fotossíntese, da modulação do fotoperíodo e da qualidade da luz (SANGWAN et al., 2001). Segundo Muniran et al. (1999), o nível de sombreamento das plantas também interfere no rendimento dos óleos essenciais. O nível de sombreamento utilizado nesse trabalho foi de 75%, o que pode explicar os resultados obtidos (qualidade da luz e menor índice de radiação) nas plantas submetidas ao sombreamento.

O cultivo das plantas de *Varronia curassavica* Jacq sob uma atenuação da luz de 66% com malha de luz azul, resulta em grandes alterações de seu

crescimento e metabolismo, de forma a possibilitar o seu desenvolvimento. Dentre as principais alterações, destacaram-se um menor desenvolvimento do sistema radicular (massa seca e volume) e da parte aérea. Porém ocorre uma maior alocação de carbono nas folhas, o que resulta na manutenção da massa seca e aumento da área foliar, como uma mudança adaptativa marcante, influenciando em grande aumento da área foliar específica.

O aumento dos teores dos pigmentos fotossintéticos, clorofila *a*, *b*, total e carotenoides totais, bem como as taxas de assimilação líquida de CO_2, condutância estomática e concentração intercelular de CO_2, constituem características adaptativas importantes das plantas sombreadas, porém, em contrapartida, com uma maior taxa de transpiração e menor eficiência do uso da água, em relação às plantas expostas a pleno sol, não resultando assim, em um efeito positivo sobre o crescimento ou parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo de carboidratos e de nitrogênio, como a produção de açúcares, aminoácidos e proteínas, absorção, transporte e assimilação de nitrato, ou mesmo produção de compostos secundários, dependentes desses processos, representados neste trabalho, pelos compostos fenólicos e produção de óleo essencial.

4. CONCLUSÃO

A espécie medicinal *Varronia curassavica* Jacq. apresenta elevada plasticidade considerando as adaptações metabólicas e de crescimento à baixa intensidade luminosa, verificadas nas condições experimentais conduzidas nesse trabalho. Porém estudos mais aprofundados em relação à composição do óleo essencial devem ser realizados para que possam ser verificadas possíveis alterações nos compostos de interesse comercial presentes no óleo essencial, que podem ser induzidos pela mudança na qualidade da luz proporcionada pela malha azul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, F. B.; GOFFART, J. P. Potential indicators based on leaf flavonoids content for the evaluation of potato crop nitrogen status. in: 11th ICPA Indianapolis Mi USA: pp. 1-18 (Mx) 2012.

ANVISA. 2011. Formulário de Fitoterápicos, Farmacopéia Brasileira, 1°Ed.,pag. 28 e 110. Brasilia-DF.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer eletrophoresis and chromatography. Analytical Biochemistry, v. 17, p. 278-293, 1966.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry,** v.72, p.248-254, 1976.

BRANT, R.S.; PINTO, J.E.B.P.; ROSA, L.F.; ALBUQUERQUE, C.J.B.; FERRI, P.H.; CORRÊA, R.M. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1401-1407, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.** 2009. 1p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2014.

BRASIL. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Cadernos de Atenção Básica, n. 31. 2012. Brasília.

BUENO, C.R. Controle ambiental e ação de reguladores de crescimento no desenvolvimento de plantas de ária **-** *Calathea allouia* (Aubl.). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, tese de Doutorado, 56p, 1989.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMPOS, F.M.; ONO, O.E; BOARO, F.S.C; RODRIGUES, D.J. Análise de crescimento em plantas de soja tratadas com substâncias reguladoras**.** **Biotemas**, 21 (3), p.53-63, 2008. ISSN 0103 – 1643.

CARNEIRO, M. A. Crescimento incial e propagação vegetativa de louro-pardo (Cordia trichotoma (Vell.) Arrab. Ex Steud. 61p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, MS, 2013.

CARVALHO JUNIOR, P.M.; RODRIGUES, R.F.O.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARQUES, M.O.M.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.297-301, 2004.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, p.314-319, 2008.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Soil Science and Plant Analysis, v. 6, p. 71-81, 1975.

COSTA, A.G.; CHAGAS, J.H.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P. Níveis de sombreamento e tipos de malha no crescimento e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta. **Horticultura Brasileira**, v.32, p. 194-199, 2014.

COSTA, A.G.; CHAGAS, J.H.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K,V, Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta cultivada sob malhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira***,* v.47, p. 534- 540, 2012.

COSTA, L.C.B.; PINTO, J.E.B.P.; CASTRO, E.M.; 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* cultivated under colored netting. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 34-39, 2010.

DIAS, C, P.; OLIVEIRA , S, L.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil; Brazilian Journal of Forestry Research. Doi: 10.4336/2012.pfb.32.72.453, 2012.

DIAS FILHO, M.B. Physiological response of *Solanum crinitum* Lam. to contrasting light environments. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 32(8): 789-796, 1997.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e no espectro de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. Propagação vegetativa por estaquia. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. (Eds). Propagação de plantas frutíferas. Brasília: **Embrapa Informações Tecnológicas**, p. 69-109, 2005.

Farmacopeia Brasileira, 4° Ed. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, segundo fascículo, 2000.

FEIJÓ, E.V.R.S.; OLIVEIRA, R.A.; COSTA, L.C.B. Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 516-523, 2014.

FERRAZ, K. K. F.; SILVA, D. M. Avaliação eco fisiológica do crescimento inicial de espécies florestais usadas na recuperação de áreas degradadas: II. *Calliandracalothyrsus* Meisn. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus. Anais Ilhéus: SBFV, 2001. CD-ROM.

FRIEND, D. J. C. and POMEROY, M. E. Changes in cell size and number associated with the effects of light intensity and temperature on the leaf morphology of wheat. **Can. J. Bot**. 48: 85–90, 1970.

GILBERT, B; FAVORETO, R. Cordia verbenaceae DC Boraginaceae: **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, vol 7, n 1, janeiro/março 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, **Química Nova**, vol. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONTIJO, T. C. A.; RAMOS, J. D.; MENDONÇA, V.; PIO, R.; ARAÚJO NETO, S. E.; CORRÊA, F. L. O. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de aceroleira utilizando ácido indolbutírico**. Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 290-292, 2003.

GRAHAM, D; SMYDZUK, J. Use of anthrone in the quantitative determination of hexose phosphates. **Anal. Biochem** 11: 246–255, 1965. doi: 10.1016/0003-2697(65)90012-6

GRAY, D.E.; PALLARDY, S.G.; GARRET, H.E.; ROTTINGHAUSS, G.E. Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry anddry weight of St. John's wort leaves and flowers. **Planta Medica**, v.69:1024, p.1030, 2003.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, [S.l.], v. 27, p. 1-93, 2006.

HE, J.; CHEE, C. W.; GOH, C. J. Photoinhibition of Heliconia under natural tropical conditions: the importance of leaf orientation for light interception and leaf temperature. **Plant, Cell and Environment**, v. 19, n. 4, p. 1238-1248, 1996.

IZQUIERDO, A.M.; TORRES, M . Del P. N.; JIMÉNEZ, G.S.; SOSA, F.C. Changes in biomass allocation and phenolic compounds accumulation due to the effect of light and nitrate supply in Cecropia peltata plants Acta Physiologiae Plantarum, v.33, p.2135–2147, 2011.

LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; ARRIGONI,-BLANK, M.F. Enraizamento de mini estacas de erva-baleeira. **Horticultura Brasileira**, Brasilia, v.15, n.2, p. 114-116,1997. Disponível em: <http://www.abhorticultura. com.br/biblioteca/arquivos/Download/biblioteca/hb_15_2.pdf>. Acesso em: 16 abril. 2014.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004. 531p.

LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S. K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **Journal of Botany**, v. 87, p. 447-455, 2000.

LIMA, J. D.; SILVA, B. M. S.; MORAES, W. S.; DANTAS, V.A.A.; ALMEIDA, C.C. Efeitos da luminosidade no crescimento de mudas de *Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. (Leguminosae, Caesalpinoideae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 1, p. 5-10, 2008.

LIU, C.Z.; GUO, C.; WANG, Y.C.; OUYANG, F. Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of Artemisia annua L. **Process Biochemistry**, v.38, p.581–585, 2002. DOI:10.1016/S0032-9592(02)00165-6.

LOPES, N. F.; OLIVIA, M. O.; CARDOSO, M. I.; GOMES, M. M. S.; SOUZA, V. F. Crescimento e conversão de energia solar em *Phaseolus vulgaris* submetido a três densidades de fluxo radiante e dois regimes hídricos. **Revista Ceres**, v. 33, n. 186, p. 114-142, 1986.

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

MARTINS, J.R.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; SILVA, A.P.O. Avaliação do crescimento e do teor de óleo essencial em plantas de *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais**,v.10, n.4, p.102-107, 2008.

MEIRA, M.R.; MARTINS, E.R.; MANGANOTTI, S.A. Crescimento, produção de fitomassa e teor de óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.2, p.352-357, 2012.

MENDES, A.D.R.; LACERDA, T.H.S.; ROCHA, S.M.G.; MARTINS, E.R. Reguladores vegetais e substratos no enraizamento de estacas de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, n.2, p. 262-270, 2014. DOI: 10.1590/S1516-05722014000200015.

MICHIELIN, E.M.; SALVADOR, A.A.; RIEHL, C.A.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E.F.; FERREIRA, S.R. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6615–6623, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.07.061.

MIOTO, R. Pais deixa de gerar US$ 5 bi por ano com fitoterapicos. **Folha de São Paulo**. Publicada em 7 jul. 2010. Disponivel em: <http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/746386-paisdeixa- de-gerar-us-5-bi-por-ano-com-fitoterapicos.shtml>. Acesso em: 6 out. 2011.

NASCIMENTO, P. K. V. Propagação vegetativa de louro-pardo (Cordia trichotoma (Vell.) Arrab. Ex Steud.) por estaquia radicular e miniestaquia. 2012. 117p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2012.

NIENOW, A.A. et al. Enraizamento de estacas de quaresmeira em duas épocas e concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 16, n. 1-4, p. 139-142, 2010.

PARISOTTO, E. B., MICHIELIN, E. M. Z., et al. J. Supercrit. Fluid, 61, p. 101-107, 2012.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; RAMOS, J.D.; VALE, M.R.; SILVA, C.R.R. Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas. Lavras: UFLA/FAEPE, 137 p. 2001.

PAULILO, M.T.S., LAPA, F.S., FALKENBERG, M.B. Effect of light intensity and growth substratum on plant development and production of secondary metabolites in *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult. **Revista Àrvore**, v. 34, p. 417-423, 2010.

PAULUS, D.; VAMORBIDA, R.; TOFFOLI, E.; NAVA, G. A. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira**, v.31, p. 203-209, 2013.

PEREIRA, D.; MOREIRA, A.E.; SILVA, J.; PRADO, M.; GASPARINI, Enraizamento adventício de Varronia curassavica Jacq. com uso de ácido indolbutírico. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science,** Guarapuava-PR**,** *v.* 9, n.1, p.113-119, 2016. DOI: 10.5935/PAeT.V9.N1.11.

PINTO, J.E.B.P.; FERRAZ, E.O.; BERTOLUCCI, S.K.V.; SILVEIRA, H.R.O.; SANTOS, A.R.; SILVA, G.M. Produção de biomassa e óleo essencial em mil folhas cultivada sob telas coloridas. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 321-326, 2014.. DOI http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362014000300014**.**

POORTER, H. & GARNIER, E. Ecological significance of inherent variation in relative growth rate and its components. **In Handbook of functional Plant Ecology**, pp. 81-120. Marcel Dekker, Inc., New York, 1999.

QUISPE-CONDORI, M.A. et al. Obtaining β-caryophyllene from Cordia verbenacea de Candolle by supercritical fluid extraction. The Journal of Supercritical Fluids, v. 46, p. 27-32, 2008.

RÊGO, G.M.; POSSAMAI, E. Avaliação dos teores de clorofila no crescimento de mudas de Jequitibá-Rosa (*Cariniana legalis*). Comunicado Técnico 128, Colombo, PR, EMBRAPA, Dezembro, 2004.

REIS, J. M. R.; CHALFUN, N. N. J.; LIMA, L. C. O.; LIMA, U. C. Efeito do estiolamento e do ácido indol butírico no enraizamento de estacas do porta-

enxerto Pyrus calleryana Dcne. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 931-938, 2000.

ROLDÃO, E. de FREITAS., et al. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenaceae* DC. (Boraginaceae), Journal of Ethnopharmacology 119, p. 94-98, 2008.

SANGWAN, N. S, FAROOGI AHA, SHABIH F, SANGWAN R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulators** 34: 03-21, 2001.

SAS Institute Inc. SAS. **Learning Edition, getting started with the SAS Learning Edition, Care**, North Carolina: 2002.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; RIGONI, M. R.; VERALDO, F. Crescimento inicial de mudas de espécies florestais nativas sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2002.

SEIGLER, D. S., et al. Struture and reactions of a cyanogenetic lipid from Cordia verbenaceae DC. Seed oil. Chem. Phys. Lipids, v.4, p.147-161, 1970.

SERTIÉ, J. A. A.; WOISKY, R. G.; WIEZEL, G.; RODRIGUES, M. Pharmacological assay of Cordia verbenacea V: oral and topical anti-in ammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v.12, p. 338-344, 2005.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E.E.; GAL, E.; GAELEVIN, R. Colornets: crop protection and light‑quality manipulation in one technology. **Acta Horticulturae**, v. 659, p.143‑161, 2004.

SOUZA, G.S.; SILVA, J.S.; OLIVEIRA, U.C.; SANTOS NETO, R.B.; SANTOS, A.R. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de plantas de alecrim cultivadas sob telas coloridas. **Bioscience Journal**, v. 30, sup.1, p. 232-239, 2014.

SOUZA, G.S., CASTRO, E.M., ÂNGELA MARIA SOARES, A.M., PINTO, J.E.B.P., RESENDE, M.G.,SUZAN KELLY VILELA BERTOLUCCI, S.K.V. Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. **Biotemas**, v. 24, n.3, p. 1-11, 2011.

SOUZA, M.F., NERY, P.S.; MANGANOTTI, S.A.; MATOS, C.C.; MARTINS, E. R. Conteúdo de óleo essencial de *Cordia verbenacea* em diferentes horários de coleta. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4(2), p. 2672-2675 (2009). Resumos VI CBA e II CLAA.

STÖHR, C.; MÄCK, G. Diurnal changes in nitrogen assimilation of tobacco roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 359, p. 1283-1289, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal. 5. ed**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

UBI B. E., HONDA C., BESSHO H., KONDO S., WADA M., KOBAYASHI, S., et al. Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature. **Plant Sci.** 170, p. 571–578, 2006.

UFPR, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica. Bioquímica: aulas práticas. 6° Ed. Curitiba: Ed da UFPR, 178 p, 2001.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. e MACIEL, M. A. M. **Plantas medicinais: cura segura?** Quím. Nova, vol.28, n.3, p. 519- 528, 2005.

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

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

WHO - World Health Organization. 1999. Monographs on selected medicinal plants. Geneva: Organização Mundial de Saúde.

YEMM, E. M.; COCKING, E. C. Estimation of amino acids by ninhidrin. **Analyst**, v.80, p. 209-213, 1955.