

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**



Dissertação

**Efeito da aplicação de estresse hídrico sob a qualidade de alface  
(*Lactuca sativa* L.)**

Bruna Trindade Paim

Pelotas, 2020.

**Bruna Trindade Paim**

**Efeito da aplicação de estresse hídrico sob a qualidade de alface  
(*Lactuca sativa* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanessa Galli

Pelotas, 2020.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas

Catálogo na Publicação

P142e Paim, Bruna Trindade

Efeito da aplicação de estresse hídrico sob a qualidade de alface (*Lactuca sativa* L.) / Bruna Trindade Paim ; Vanessa Galli, orientadora. — Pelotas, 2020.

72 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas,

2020

1. Elicitores abióticos. 2. Hortaliça. 3. Priming. 4. Pós-colheita. 5. Ácidos fenólicos. I. Galli, Vanessa, orient. II. Título.

CDD : 664

Bruna Trindade Paim

**Efeito da aplicação de estresse hídrico sob a qualidade de alface  
(*Lactuca sativa* L.)**

Data da Defesa: 14 de fevereiro de 2020.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Adriana Dillenburg Meinhart. Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas.

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. Doutor em Biologia Molecular pela Ensat-Toulouse-France.

Dra. Isabel Lopes Vighi. Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dra. Vanessa Galli. Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Dedico este trabalho a minha amada e eterna avó materna Branca, na qual sempre acreditou em mim e nos meus sonhos. À minha família, mãe Jaque, padrasto Nelcy, meus irmãos Renan e Dimitri que sempre me apoiaram, dando-me forças.**

## **Agradecimentos**

A Deus nosso senhor primeiramente pela vida que me deste.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À Profa. Dra. Vanessa Galli, minha orientadora, que carinhosamente apelidei de Mãe Vanessa, pois trata o seu grupo como uma família, foste de extrema importância nessa jornada na qual descobri um novo mundo da biotecnologia, meu muito obrigada por tudo, principalmente pela paciência, respeito e minha admiração eterna por esta profissional na qual me inspira.

Aos meus professores de departamento.

Aos meus colegas de laboratório 710 e Lab 2 pelo dia-a-dia na qual com passar do tempo se torna nossa família, pois passamos mais tempos juntos do que em nossas próprias casas, muito obrigada por tudo durante estes anos juntos, foram fundamentais para minha vida.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram presente nesse trabalho de forma direta, me auxiliando e ajudando, como também os apoios morais.

As minhas amigas e vizinhas do Valle del Fiore, foram fundamentais, vou guarda vocês no coração para sempre, em especial minha amiga de longa jornada de vida, Mariana Salbego, minha irmã de coração.

Aos meus amigos desde a graduação que sempre me incentivaram a seguir.

Ao meu noivo Pedro que sempre me motivou a estudar e seguir meus sonhos, com paciência, sabedoria, soube me ouvir, conduzir, motivar e demonstrar que a distância não significa nada quando duas pessoas se amam.

Ao grupo de bolsistas Capes do Facebook, por cada meme e motivação.

Por fim, à CAPES pelo apoio financeiro.

*“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a sombra das folhas; se não houver folhas, valeu a intenção da semente” - Henfil*

## Resumo

PAIM, Bruna Trindade. **Efeito da aplicação de estresse hídrico sob a qualidade de alface (*Lactuca sativa* L.)** 2020. 72f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais difundida no mundo, cultivada em diversos países. No entanto, as cultivares comercialmente disponíveis apresentam um teor baixo de compostos funcionais, comparado a diversas outras hortaliças. Além disso, o período de pós-colheita se caracteriza como uma etapa estressora, afetando a qualidade desta folhosa. Uma estratégia que tem se mostrado eficaz para aumentar o conteúdo de compostos funcionais nas plantas é a aplicação de elicitores abióticos, a exemplo do estresse hídrico em níveis. Isto ocorre porque ao perceber este estresse as plantas induzem a produção de compostos relacionados ao metabolismo de defesa, os quais incluem compostos do seu metabolismo secundário, que apresentam efeito funcional quando ingeridos na dieta. Além disso, existem evidências de que plantas submetidas a estes elicitores apresentam maior tolerância a estresses subsequentes, como os advindos do processo de armazenamento no pós-colheita. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da aplicação pré-colheita de níveis de estresse hídrico na qualidade pré e pós-colheita de alface. Para isso, as plantas de alface foram cultivadas com o volume de água necessária para saturação de 100% do solo (C, controle), 90% (EH 90%), 80% (EH 80%), ou foram submetidas a um estresse agudo (EH), onde as plantas foram cultivadas na mesma condição que o controle, mas não receberam água durante 4 dias antes da colheita. Após a colheita uma parcela de plantas foi armazenada à 6-8°C e 80% umidade para análises de pós-colheita. A aplicação do estresse hídrico resultou em plantas com maior biomassa nos tratamentos EH 90% e EH, e não afetou a coloração ou a firmeza das plantas. O tratamento EH 80% destacou-se quanto aos parâmetros de qualidade, pois resultou em plantas com maior conteúdo de carotenoides, clorofilas, ácido caféico, ácido mono-caféico-tartárico, Malercil glucósido de quercitina, quercitina-3-O-glucuronida, e maior atividade antioxidante total, no momento da colheita. As

plantas submetidas ao estresse hídrico não apresentaram mudanças na firmeza durante o armazenamento, porém apresentaram incremento no conteúdo de flavonoides, em EH, e um número menor de compostos fenólicos que tenham sido afetados negativamente pelo armazenamento. Os resultados indicam que a aplicação de estresse hídrico, especialmente no nível de 80%, em alface representa uma estratégia interessante para melhorar a qualidade desta hortaliça no momento da colheita e após armazenamento.

**Palavras-chave:** Elicitores abióticos, 'priming', ácidos fenólicos, hortaliça, pós-colheita.

## Abstract

PAIM, Bruna Trindade. **Effect of water stress application on lettuce quality (*Lactuca sativa* L.)** 2020. 72f. Dissertation (Master Degree in Food Science and Technology) – Graduate Program in Food Science and Technology, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is the most widespread leafy vegetable in the world, grown in several countries. However, commercially available cultivars have a low content of functional compounds, compared to several other vegetables. In addition, the postharvest period is characterized as a stressful stage, affecting the quality of this vegetable. One strategy that has been shown to be effective in increasing the content of functional compounds in plants is the application of abiotic elicitors, such as drought stress at moderate levels. This is because when perceiving this stress, plants induce the production of compounds related to defense metabolism, which include compounds from their secondary metabolism, which have a functional effect when ingested in the diet. In addition, there is evidence that plants submitted to these elicitors have greater tolerance to subsequent stresses, such as those arising from the postharvest storage. This work aims to evaluate the effect of the pre-harvest application of moderate levels of water stress on the pre and postharvest quality of lettuce. For this, lettuce plants were grown with the volume of water needed to saturate 100% of the soil (C, control), 90% of the soil (EH 90%), 80% of the soil (EH 80%), or they were subjected to short-term acute stress (EH), where the plants were grown in the same condition as the control, but did not receive water for 4 days before harvest. After harvesting, a portion of plants was stored at 6-8 °C and 80% humidity for postharvest analysis. The application of moderate drought stress resulted in

plants with higher biomass in treatments EH 90% and EH and did not affect the color or firmness of the plants. The EH 80% treatment stood out in terms of quality parameters, as it resulted in plants with a higher content of carotenoids, chlorophylls, caffeic acid, mono-caffeic-tartaric acid, Malercyl glucoside of quercitin, quercitin-3-O-glucuronide, and greater total antioxidant activity at harvest. Plants submitted to moderate water stress did not show changes in firmness during storage, but showed an increase in the content of flavonoids, in EH, and a smaller number of phenolic compounds that have been negatively affected by storage. The results indicate that the application of moderate water stress, especially at the 80% level, on lettuce represents an interesting strategy to improve the quality of this vegetable at harvest and after storage.

**Keywords:** Abiotic elicitors, 'priming', phenolic acids, vegetables, postharvest.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Biossíntese dos compostos fenólicos .....	21
Figura 2- Rota metabólica de fenilpropanóides nas plantas.....	22
Figura 3 - Rota metabólica do ácido L-ascórbico. ....	24
Figura 4 -Síntese de tocoferóis iniciando pelo 4-Hidroxifenilpiruvato. ....	26
Figura 5 - Biomassa de alfaces submetidos a estresse hídrico.....	40
Figura 6 - Características fenotípicas de alfaces submetidos a estresse hídrico .....	40
Figura 7- Características fenotípicas da pós-colheita (último dia de armazenamento) alfaces submetidos a estresse hídrico .....	41
Figura 8- Conteúdo de carotenoides e clorofilas totais em folhas de alfaces submetidos a estresse hídrico.....	43
Figura 9- Conteúdo de flavonoides e compostos fenólicos totais em folhas de alfaces submetidas a estresse hídrico. ....	44
Figura 10- Atividade antioxidante em folhas de alfaces submetidas a estresse hídrico .....	44
Figura 11 – Cromatograma dos compostos fenólicos individuais em alfaces sob estresse hídrico. ....	46
Figura 12 – Cromatograma dos compostos fenólicos individuais em alfaces sob estresse hídrico. ....	47
Figura 13- Conteúdo de compostos fenólicos em folhas de alfaces submetidos a estresse hídrico. ....	48

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1-Tratamentos realizados no presente estudo .....	34
Tabela 2- Firmeza de folhas de alface submetidas a estresse hídrico e armazenadas durante sete dias a 4 °C e 80% de umidade relativa. ....	41
Tabela 3- Coloração das folhas de alface submetidas a estresse hídrico e armazenadas durante sete dias a 4 °C e 80% de umidade relativa. ....	42
Tabela 4- Compostos fenólicos identificados por LC-MS/MS em alfaces submetida ao estresse hídrico.....	45

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

BOD Biochemical Oxygen Demand

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: High Performance Liquid Chromatography)

MS Espectrometria de massas (do inglês: mass spectrometry)

NIST Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês: National Institute of Standards and Technology)

NS Não Significativo

UR Umidade Relativa

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>18</b>
2.1	Objetivo geral .....	18
2.2	Objetivos específicos .....	18
<b>3</b>	<b>Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>19</b>
3.1	Alface .....	19
3.1.2	Compostos funcionais presente na alface .....	20
3.1.2.1	Utilização de estresses como estratégia de incremento de compostos funcionais .....	28
3.1.3	Alfaces no Pós-colheita .....	30
<b>4</b>	<b>Material e Métodos .....</b>	<b>33</b>
4.1	Material.....	33
4.1.1	Cultivo das plantas de alface em condições de estresse hídrico.....	33
4.2	Métodos .....	34
4.2.1	Características físicas das alfaces .....	34
4.2.2	Clorofila e Carotenoides totais .....	35
4.2.3	Compostos fenólicos totais .....	35
4.2.4	Flavonoides totais.....	36
4.2.5	Atividade Antioxidante .....	37
4.2.4	Análise cromatográfica por HPLC-MS.....	37
4.2.4.1	Compostos fenólicos individuais .....	37
4.4	Análise estatística .....	39
<b>5</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>40</b>
5.1.	Efeito do estresse hídrico em parâmetros de qualidade (massa, textura, cor) .....	40
5.1.2	Efeito do estresse hídrico em parâmetros de qualidade funcional.....	42
5.1.2.1	Compostos fenólicos individuais .....	45
<b>6</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Considerações finais.....</b>	<b>54</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>69</b>

## 1 Introdução

O consumo de hortaliças vem crescendo, uma vez que diversos compostos presentes nestas tem sido associado positivamente com o aumento na qualidade de vida. Isso se deve a alguns benefícios proporcionados por estes compostos como o sequestro de radicais livres, o combate ao envelhecimento prematuro das células, a redução na susceptibilidade a infecções, a atividade anti-inflamatória, a prevenção de algumas doenças crônicas, dentre outras (Connolly, 2008; Johns e Eyzaguirre, 2007). Desta forma, diversos esforços têm sido direcionados na busca por incremento da qualidade nutricional e funcional dos alimentos, uma estratégia conhecida como biofortificação (Messias *et al.*, 2013; Escamilla *et al.*, 2017).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliça folhosa mais difundida no mundo, sendo cultivada em diversos países (Cassetari, 2012; Jacinto, 2018). Sua produção mundial em 2018 foi de 26,8 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2018). No Brasil, possui uma grande importância tendo em vista sua produção de 1,5 milhões de toneladas em 2017, a qual é facilitada pelo fato de apresentar um ciclo de vida curto (Jacinto, 2018).

Apesar de ser considerada fonte de diversas vitaminas como C e E, minerais, fitoquímicos, principalmente carotenoides, clorofila e compostos fenólicos. Entretanto mesmo está sendo uma hortaliça de grande consumo, ela apresenta conteúdo de compostos fenólicos inferior a 27 outras plantas menos consumidas (Chu *et al.* 2002; Song *et al.* 2010). Além desse composto, as cultivares comerciais de alface comerciais apresentam um teor baixo de carotenoides precursores de vitamina A (Cassetari, 2012). Sendo assim, aumentar o conteúdo de compostos funcionais em uma hortaliça altamente consumida como a alface é de grande relevância.

Dentre as estratégias de biofortificação, podemos citar: o melhoramento convencional, práticas de manejo agrícola, uso de fertilizantes e/ou bioestimulantes, melhoramento genético (geração de organismos geneticamente modificados), e uso de elicitores bióticos ou abióticos (CORDENUNSI *et al.*, 2005, JIMÉNEZ-BERMÚDEZ *et al.*, 2002, WANG e GAO, 2013). Os elicitores abióticos incluem os estresses hídrico, salino, de

temperatura (frio ou calor), radiação ultravioleta, dentre outros. Estes estresses induzem a produção de compostos relacionados ao metabolismo de defesa, os quais incluem compostos do seu metabolismo secundário, que apresentam efeito funcional quando ingeridos na dieta (Almeida *et al.*, 2016; Jacinto, 2018). Embora estresses abióticos severos causem prejuízos ao crescimento e desenvolvimento das plantas, quando aplicados em nível leves podem promover este efeito biofortificante sem afetar negativamente a produtividade da cultura (BOROWSKI *et al.*, 2014).

Além disso, há evidências de que plantas submetidas a estresses abióticos apresentam maior tolerância a estresses subsequentes, como os advindos do processo de armazenamento no pós-colheita. Este efeito se daria pelo fato de as células vegetais já apresentarem o metabolismo direcionado à produção de metabólitos de defesa, em virtude do primeiro estresse infligido (Zlotek e *et al.*, 2013; Perin, 2014). A aplicação deliberada de estresses visando a tolerância a estresses subsequentes tem sido denominada de 'priming'.

A alface inicia o seu processo de deterioração a partir do momento em que entra no estado de senescência. Sendo assim, os cuidados com o manejo devem ser estabelecidos desde o plantio até o armazenamento, visando obter um produto com maior qualidade nutricional e sensorial (Nascimento *et al.*, 2017). Após colhida, a alface é susceptível à perda de água, o que afeta características sensoriais como a firmeza e crocância, e leva à diminuição da vida de prateleira e aumento do custo final do produto para o consumidor (Santos *et al.*, 2018). Assim, este período pós-colheita se caracteriza como uma etapa estressora, que acarreta em uma série de modificações físicas, químicas e moleculares nas células vegetais, afetando a qualidade desta folhosa (Cassetari, 2012). Desta forma, estratégias pré-colheita, como o 'priming', que possam reduzir perdas pós-colheita são de grande interesse.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da aplicação pré-colheita de níveis de estresse hídrico na qualidade pré e pós-colheita de alface.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da aplicação pré-colheita de níveis de estresse hídrico sobre os parâmetros de firmeza, cor, atividade antioxidante e conteúdo de clorofilas totais, carotenoides totais e compostos fenólicos totais e individuais em alfaces, no momento da colheita;
- Verificar o efeito, após armazenamento, de níveis de estresse hídrico sobre plantas de alfaces em relação aos parâmetros de firmeza, cor, atividade antioxidante e conteúdo de clorofilas totais, carotenoides totais e compostos fenólicos totais e individuais.

### 3 Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) faz parte das plantas herbáceas, pertencente à família Compositae (CHON *et al.*, 2005), sendo a única espécie domesticada cujo gênero possui mais de cem espécies selvagens (LEBEDA *et al.*, 2014). Esta planta apresenta folhas presas, unidas ao pequeno caule, sendo de consistência tenra. A alface é a hortaliça folhosa mais consumida no mundo e de consumo constante ao decorrer de todo o ano (ZDRAVKOVIC *et al.*, 2014), seja por suas características sensoriais ou pela presença de compostos funcionais e nutricionais (LLORACH *et al.*, 2008).

O consumo dessa hortaliça tem relevância de caráter socioeconômico mundial, por ser a de cultivo mais expressivo em pequenas propriedades, já que se trata de uma planta de ciclo curto e de baixa suscetibilidade a pragas e doenças (ZDRAVKOVIĆ *et al.*, 2013). Em 2016, 26,8 milhões de toneladas de alface foram produzidas no mundo, destacando-se a Europa e Estados Unidos com maior consumo de alface (FAOSTAT, 2018). No Brasil, sua produção ocorre durante todos os meses do ano, trazendo empregos diretos para agricultores familiares, criando cinco empregos diretos para cada hectare de cultivo (COSTA; SALA, 2005). Em 2017, mais de 1,5 milhões de toneladas de alface foram produzidas no Brasil, sendo as variedades 'Crespa' e 'Americana' as mais consumidas, movimentando anualmente um montante de 8 bilhões de reais em varejos (ABCSEM, 2015; Cassetari, 2012; Jacinto, 2018).

O ciclo de cultivo da alface varia de 40 a 70 dias dependendo da cultivar, da época de plantio (verão ou inverno), e do sistema de plantio, podendo este ser realizado através de semeadura direta ou transplante de mudas, e o cultivo ser realizado a campo ou em ambiente protegido (LIMA, 2007).

No Brasil, aproximadamente 50 cultivares diferentes de alfaces são produzidas, sendo sua comercialização determinada pela necessidade do comércio e condições edafoclimáticas de cada local (SALA; COSTA, 2012). Cada cultivar apresenta características morfológicas e fisiológicas distintas. Nas regiões onde as temperaturas são majoritariamente baixas, como no sul e sudeste do país, são utilizadas as cultivares resistentes a baixas temperaturas; tais como cultivar: 'Condensa', 'Loreane' e 'Rubinela'. Já em climas quentes se

cultiva as resistentes ao pendoamento e ao florescimento precoce como as cultivares 'Rafaela', 'Mônica', 'Luiza' e 'Regina', pois nestes locais o fotoperíodo maior e as temperaturas mais altas induzem a estes efeitos fisiológicos. Porém, de forma geral, a maior parte dos cultivares se estabelecem em temperaturas amenas, de 15 °C à 24 °C (EDI, 2019; HENZ; SUINAGA, 2009).

As cultivares de alface do tipo crespa são as mais produzidas no Brasil. As principais características destas são: a presença de folhas com enervações e do tipo flabelada, e ausência de formação da cabeça, levando estas cultivares a apresentarem um desempenho agrônômico melhor (SALA; COSTA, 2012). A cultivar 'Veneranda' é uma das mais produzidas e consumidas, devido as suas propriedades, onde apresenta-se com folhas crespas, coloração verde-claro brilhante, além de tolerância a LMV (*lettuce mosaic virus*), ao pendoamento precoce e a altas temperaturas (FELTRIN, 2020).

### **3.1.2 Compostos funcionais presente na alface**

O consumo de frutas e hortaliças na dieta humana tem se intensificado devido sua relação com a prevenção de doenças, e conseqüente melhoria na qualidade de vida (LLORACH *et al.*, 2008). A alface apresenta diversas vitaminas, minerais e compostos fenólicos, que, juntamente com seu valor calórico baixo e alto teor de fibras, a tornam de interesse aos consumidores preocupados com sua saúde (KOŁTON *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2009). No entanto, quando comparada com outras hortaliças, apresenta teores baixos destes compostos, principalmente os com atividade antioxidante (CHU *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2010). Apesar disso, por ser consumida regularmente, a alface se torna uma das fontes de antioxidantes, devido ao consumo dieta humana, principalmente na sua forma fresca (BOROWSKI *et al.*, 2014). Sendo assim, estratégias visando seu incremento nutricional/funcional, também conhecidos como estratégias de biofortificação, são relevantes, especialmente por se tratar de uma hortaliça de consumo diário (HAWRYLAK-NOWAK, 2013; BOROWSKI *et al.*, 2014).

A biofortificação tem como premissa básica a indução das rotas metabólicas endógenas, de forma que ocorra a síntese dos compostos específicos de forma intensificada, sem interferir negativamente no desenvolvimento e crescimento da cultura (ZHU, *et al.*, 2013). Por este motivo,

é importante que se conheçam os compostos que se deseja biofortificar, bem como suas rotas metabólicas biossintéticas. A seguir, estão descritos os principais compostos funcionais em alface, e como estes são sintetizados.

### *Compostos fenólicos*

Os compostos fenólicos englobam uma enorme gama de substâncias químicas que, possuem estruturas diversificadas, podendo gerar diversos compostos derivados. Conferem variadas propriedades aos alimentos, e apresentam diversas atividades biológicas quando ingeridos na dieta, tais como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante (TIAN *et al.*, 2017).

Quimicamente essas substâncias possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados (DEL RIO *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos mais importantes encontrados na dieta incluem os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos.

Os flavonoides são os pigmentos mais comuns depois da clorofila e dos carotenoides (STALIKAS, 2007) e podem ser divididos em diferentes classes, dentre elas estão flavanóis, flavonóis, flavonas, isoflavonoides, flavononas e antocianinas (COUTINHO *et al.*, 2009). A síntese destes compostos ocorre via ácido chiquímico (Figura 1), onde a enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) catalisa a reação de desaminação do aminoácido L-fenilalanina formando o ácido cinâmico. Após, ocorrem sucessivas reações enzimáticas (Figura 2), incluindo a atuação da enzima flavonol sintase (FLS), responsável pela formação dos flavonoides; e da enzima UDP flavonoide glicosiltransferase (UFGT), que atua na formação das antocianinas (CHEYNIER, 2012).

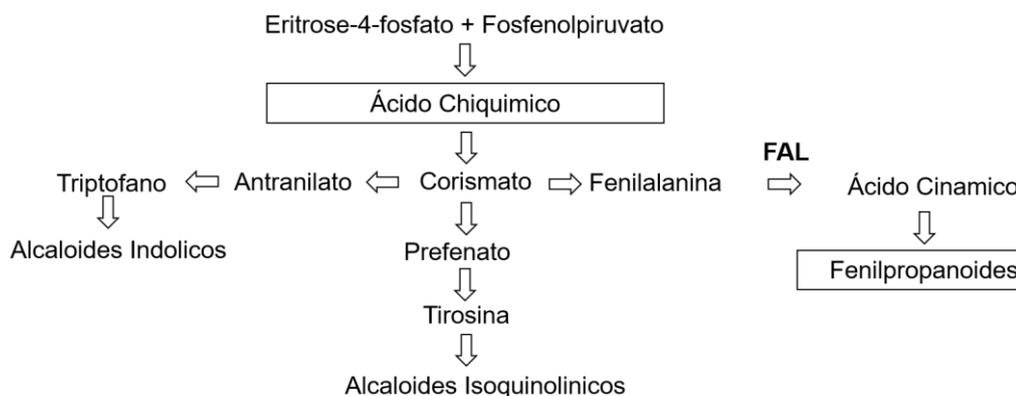


Figura 1 - Biossíntese dos compostos fenólicos.  
Fonte: Adaptado de Holton *et al.*, 1995.

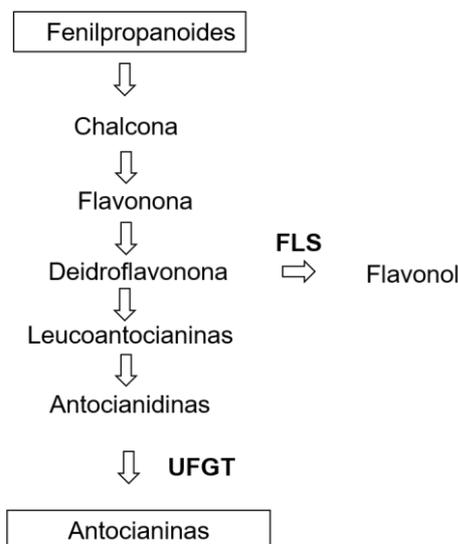


Figura 2- Rota metabólica de fenilpropanóides nas plantas. Fonte: Adaptado de Holton et al., 1995.

Os compostos fenólicos são derivados das vias pentose-fostato, chiquimato e fenilpropanóides em plantas, onde estes compostos desenvolvem um papel importante para o crescimento e reprodução das plantas, atuando na proteção ao ataque de patógenos e predadores. Além disso, contribuem para as características sensoriais de vegetais e frutas. Eles podem ser divididos em diferentes classes, dentre elas estão fenólicos aliados e polifenólicos, terpenóides e alcalóides (VUOLO et al., 2019).

As propriedades biológicas e físico-químicas dos compostos fenólicos variam conforme a disponibilidade nas plantas. Por exemplo, atuam na formação dos pigmentos, os quais desempenham papel importante na polinização, na resposta a estresses bióticos e abióticos, e apresentam capacidade antioxidante, atuando como sequestrantes de radicais livres, por seu perfil do grupamento hidroxila, inibindo enzima oxidativa (DEL RIO *et al.*, 2014). Diversas metodologias demonstram uma correlação do conteúdo de compostos fenólicos e do potencial antioxidante de vegetais, frutas e hortaliças dos mais variados tipos (ABDILLE *et al.*, 2005; ALTUNKAYA; GARCÍA-MACÍAS *et al.*, 2007; GÖKMEN, 2008; HEIMLER *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2006; CALDWELL, 2003). Os compostos fenólicos totais se mostram com impacto positivo em diversos estudos, como na prevenção de doenças crônicas, como alguns tipos de câncer, inibindo a taxa de crescimento celular e induzindo a apoptose (ROLEIRA *et al.*, 2015, MITJAVILA; MORENO, 2012).

O principal componente fenólico presente na alface é o ácido caféico, especialmente esterificado com ácido clorogênico, ácido chicórico e ácido málico. Os flavonoides aparecem em menor porção, sendo estes derivados de quercitina e kaempferol (TAVARINI *et al.*, 2008; LLORACH *et al.*, 2008; RIBAS-AGUSTI *et al.*, 2011). Os compostos fenólicos em alfaces estão bem elucidados na literatura (DU PONT *et al.*, 2000).

Gurdon *et al.* (2019) realizou uma análise de biodisponibilidade *in vivo* com camundongos que tinham diabetes tipo 2, administrando diariamente via oral um extrato de RSL (*Rutgers Scarlet Lettuce*) liofilizada que possuía alto teor de compostos fenólicos, onde demonstrou efeitos hipoglicemiantes. Outro estudo de suplementação resultou na diminuição dos níveis de colesterol total no sangue e triglicerídeos em camundongos alimentados com pó de alface (8%) liofilizado, rico em fenóis na alimentação dos animais por meio de uma ração (LEE *et al.*, 2009).

SONG *et al.* (2010) correlaciona os fenóis contidos na alface com outras espécies de vegetais e demonstra que a alface se encontra no vigésimo oitavo lugar quando comparado com outras hortaliças consumidos no mundo. Reconhecendo o consumo da alface como alimento do cotidiano da população, estudos visam esse incremento na cultura. Fatores ambientais como a intensidade de luz, temperatura, disponibilidade de água por restrição ou encharcamento do solo, nutrientes do solo, podem influenciar no conteúdo destes compostos (DURAZZO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016).

#### *Ácido L-ascórbico*

A Vitamina C é representada por dois componentes que possuem atividade biológica: o Ácido Ascórbico (AA), principal componente, e o Ácido Desidroascórbico (DHA), importante na dieta humana por seus efeitos fisiológicos (ALSCHER *et al.*, 1993; DEUTSCH, 2000). O AA participa da regulação do crescimento e metabolismo das plantas. Nos tecidos vegetais, colabora na ação redutora, eliminando os radicais livres e na atividade enzimática das reações químicas. Na forma de DHA é importante pois o corpo humano não sintetiza esse metabólito (LOCCATO; CIMINI; GARA, 2013).

O AA é sintetizado a partir de guanosina difosfato (GDP) manose (GDP-D-manose), havendo duas vias de síntese: a via do mio-inositol, onde GDP-D-

manose é convertida a GDP-L-gulose e essa em L-gulose e, subsequentemente a L-gulano-1,4 lactano que é então oxidada em ácido L-ascórbico; e a via D-manose/L-galactose, também conhecida por via Smirnoff-Wheeler, onde GDP-D-manose é convertida a GDP-L-galactose, que é convertida a L-galactose, que pela ação da D-galacturonato é sintetizado L-galactano-1,4-lactano, o qual é oxidado a ácido L-ascórbico. (WHEELER; JONES; SMIRNOFF, 1998; SMIRNOFF; NICHOLAS, 2018).

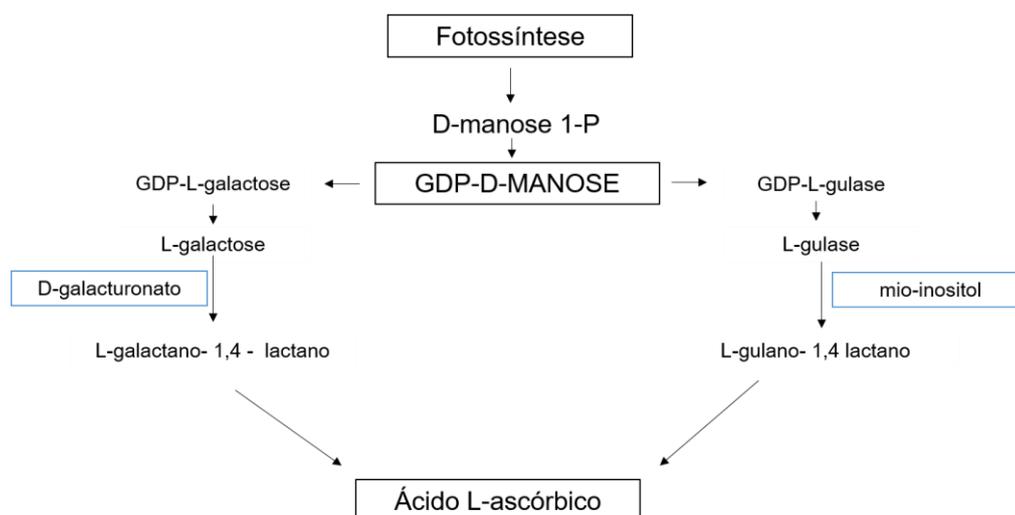


Figura 3 - Rota metabólica do ácido L-ascórbico. Fonte: Adaptado de Smirnoff e Wheeler, 2000.

Existe também a via de reciclagem do ácido L-ascórbico, possuindo a principal função de regulação do próprio composto, juntamente com o processo de síntese, degradação e transporte da rota (STEVENS *et al.*, 2008, YIN *et al.*, 2010). Nesta via, pela ação da enzima APX (ascorbato peroxidase), o AA é convertido a ácido monodehidroascórbico, com a concomitante redução do peróxido de hidrogênio em água, sendo que pode se converter em ácido dehidroascórbico (GALLIE, 2013).

Nas plantas o ácido L-ascórbico participa como um cofator enzimático, eliminando espécies reativas do oxigênio (EROS). Também atua na resposta a estresses bióticos e/ou abióticos, regulando funções fisiológicas e bioquímicas desde o processo de germinação da semente, passando pela indução da floração, fotossíntese, expansão dos tecidos vegetais dos frutos e senescência (AKRAM; SHAFIQ; ASHRAF, 2017). O ácido ascórbico é um importante indicador, pois tem característica termolábil; sua integridade nos alimentos indica a preservação de outros nutrientes dentro do alimento (CARDELLO e

CARDELLO, 1998). Mattos (2007) diz que a degradação do ácido ascórbico favorece o escurecimento não enzimático, resultado da ação da polifenoloxidase e a peroxidase, catalisando reações que levam ao desbotamento das plantas e formação de compostos aromáticos indesejáveis, perdendo nutrientes e escurecendo os tecidos.

Entre as suas funções no organismo humano pode-se destacar a participação na produção de colágeno, através do metabolismo da tirosina, e na biossíntese e na absorção de ferro não-heme (LEE e KADER, 2000). Sendo, portanto, importante sua ingestão na dieta humana. A deficiência de vitamina C no organismo pode ser notada por alguns sintomas: como fadiga, insônia, baixando a imunidade e facilitando a suscetibilidade a infecções e perda de peso (SMIRNOFF; NICHOLAS, 2018). Seu benefício é relatado na literatura como redutor do risco de diversas doenças, câncer, distúrbios relacionados a doenças bucais e cardiovasculares. Quando uma ingestão diária não é suficiente se utiliza a suplementação na dieta (VISSERS *et al.*, 2011, GESS *et al.*, 2015).

A alface se demonstra uma fonte de AA, por se tratar de um alimento de consumo fresco, o que preserva a integridade do composto. Segundo Morais *et al* (2010), a alface fresca apresenta um conteúdo de AA de 16,52 mg/100g, conteúdo esse inferior a outros vegetais como brócolis, couve-flor e espinafre (LOCATTO; CIMINI; GARA, 2013). Devido sua importância para a saúde, esse metabólito tornou-se de grande relevância para pesquisas científicas (AKRAM *et al.*, 2017).

#### *$\alpha$ -tocoferol*

O  *$\alpha$ -tocoferol* pertence ao grupo de compostos de vitamina E, fazendo parte dos antioxidantes naturais mais pesquisados (GODIM, 2009). O termo vitamina E é utilizado para se referir a oito diferentes compostos, divididos em dois grandes grupos, tocoferóis (primeiro grupo) e os tocotrienóis (segundo grupo). O tocoferol chama-se de primeiro grupo, que é derivado do tocol, grupo de cadeia saturada de dezesseis carbonos. Esse grupo inclui quatro dos oito compostos, sendo eles o  *$\alpha$ -tocoferol*,  *$\beta$ -tocoferol*,  *$\gamma$ -tocoferol* e o  *$\delta$ -tocoferol* (BALL, 1998; BIANCHINI; PENTEADO, 2003). Os tocoferóis estão presentes naturalmente em alimentos de origem vegetal, como nas frutas, vegetais verde

escuras, em sementes oleaginosas e nos óleos vegetais (SETIADIA *et al.*, 2003). Os tocotrienóis (segundo grupo) possuem uma cadeia lateral insaturada contendo 16 átomos de carbono (AZZI e STOCKER, 2000; CERQUEIRA *et al.*, 2007). Os alimentos são a maior fonte de vitamina E através da ingestão para a população (GUINAZI, 2009). **tocoferol**

O principal local de síntese de tocoferóis acontece nos plastídios das plantas, local onde dois compostos podem atuar como precursores de suas vias metabólicas. Um deles é o ácido homogentísico (HGA), derivado do 4-hidroxifenilpiruvato (HPP) proveniente da via metabólica de chiquimato, que, juntamente com fitildifosfato origina 2-metil-6-fitol-1,4-benzoquinona metiltransferase (MPQ), pela ação catalítica da enzima homogentisato preniltransferase (VTE2, HPT1) (ROHMER 2003). Já MPQ serve de substrato para a síntese de  $\delta$ -tocoferol (por ação da enzima VTE1), e de  $\beta$ -tocoferol (por ação da enzima VTE4/TMT). A MPQ pode também ser metilada em 2,3-dimetil-5 fitil benzoquinona (DMPQ), agindo como substrato para a síntese de  $\gamma$ -tocoferol com o auxílio da enzima VTE4/TMT convertendo em  $\alpha$ -tocoferol, como exemplificado na figura 4 (SMIRNOFF; NICHOLAS 2007).

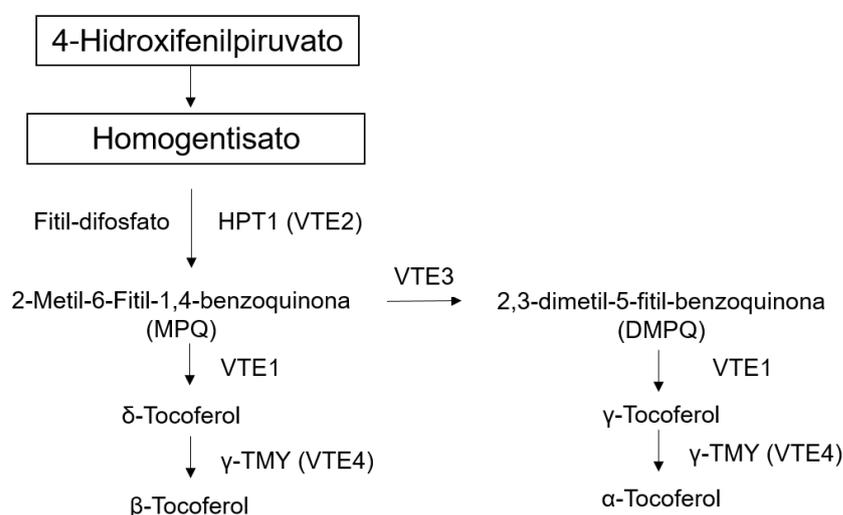


Figura 4 - Síntese de tocoferóis iniciando pelo 4-Hidroxifenilpiruvato. Fonte: Adaptado de Mène Saffrané, 2017.

Estes compostos possuem características lipofílicas na planta, atuando como excelentes antioxidantes por protegerem membranas celulares, além de estabilizarem reações oxidativas nos óleos vegetais e gorduras animais

(HAUMANN, 1990; SHIN; GODBER, 1994; TAKUR; SRIVASTA, 1996; KIM *et al.*, 2001; RODRIGUES; ONOYAMA; MEIRELLES, 2006; BRUSCATTO *et al.*, 2009). Também possuem função de integridade e rigidez das membranas fotossintéticas, protegendo os tecidos, pela ação da eliminação dos radicais de peróxido, protegendo os lipídeos da peroxidação e atuando como sinalizador nas células (MUNNÉ-BOSH, 2007).

Esses compostos tocoferóis são essenciais na dieta humana, sendo encontrados somente em organismos fotossintéticos. Atuam melhorando a função imunológica do organismo humano e prevenindo algumas doenças: degenerativas, câncer, catarata, neurológicas e cardiovasculares. O  $\alpha$ -tocoferol exerce função importante como inibidor da oxidação dos radicais livres, reagindo com o oxigênio e impossibilitando a transformação dos ácidos graxos insaturados em aldeídos (FREITAS, 2007; MENTE *et al.*, 2009, WANG *et al.*, 2015, PEH *et al.*, 2015). Tem sido utilizado também em fármacos cosméticos visando o tratamento contra o envelhecimento cutâneo (ALMEIDA, 2008).

Estudos sugerem que a síntese de tocoferóis é reguladora durante todo o processo de desenvolvimento da planta. Pois, fatores como estresse, seja por alta luminosidade, baixa temperatura, seca e estresse salino aumentam e/ou diminuem a síntese desse metabólito (GOSSETT *et al.*, 1994; STREB *et al.*, 1994; LEIPNER *et al.*, 1999; HAVAUX *et al.*, 2000; MUNNE-BOSCH E ALEGRE, 2000). Além disso, o processo de degradação da clorofila durante a senescência foliar gera danos oxidativos nas membranas fotossintéticas, aumentando o conteúdo dos tocoferóis (MUÑOZ e MUNNÉ BOSCH, 2018).

Segundo Méne-Saffrané e Pellaud (2017) a população não consome doses suficiente de vitamina E na dieta, apresentando deficiência dessa vitamina em seu organismo. Por isso, tem se buscado alternativas para o incremento deste composto nos alimentos. Na alface o teor total de tocoferol é de cerca de 0,5  $\mu\text{g/g}$ , com relação  $\alpha$ -/ $\gamma$ -tocoferol de 0,26. Portanto, o conteúdo e a composição de tocoferóis na alface podem ser melhorados.

### 3.1.2.1 Utilização de estresses como estratégia de incremento de compostos funcionais

A alface, por ser a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil e no mundo, e por apresentar baixos níveis de compostos funcionais, torna-se um alvo de interesse para estudos de biofortificação.

Existem diversas técnicas agrônômicas para o aumento dos teores de compostos funcionais em frutas e hortaliças, dentre elas o melhoramento convencional, a modificação genética e a aplicação de elicitores. Os elicitores podem ser bióticos ou abióticos e tem se tornando popular devido ao baixo custo e forma de aplicação simples (MORENO-ESCAMILLA *et al.*, 2017). Os elicitores abióticos incluem estresses como seca, deficiências nutricionais, escassez de luz, temperatura extrema, salinidade e metais pesados (HERMS E MATTSON, 1992). A premissa básica de atuação destes elicitores é de que, ao serem aplicados nas plantas, ativam seus mecanismos de defesa contra estresses, que incluem a produção de antioxidantes, que atuam como sequestrantes de espécies reativas de oxigênio (EROS) (MORENO-ESCAMILLA *et al.*, 2017). Os antioxidantes podem ser de natureza enzimática ou não enzimática, sendo que esta última classe inclui os compostos do metabolismo especializado das plantas. Em alfaces, fazem parte desta classe o ácido ascórbico, os tocoferóis, os carotenoides e os compostos fenólicos (McKERSIE e LESHEM, 1994). Uma vez que estes compostos apresentam grande relevância e benefícios aos humanos quando ingeridos na dieta, a utilização de elicitores abióticos visando induzir a produção destes compostos se torna uma alternativa promissora em alface.

No entanto, é importante que o nível do estresse elicitador aplicado seja avaliado, uma vez que estresses severos geralmente resultam em efeitos negativos ao crescimento e desenvolvimento das plantas (MALEJANE *et al.*, 2017). Por outro lado, a aplicação de diferentes níveis de estresses tem se mostrado eficiente para aumentar a resistência das plantas a estresses, bióticos e abióticos, e também para melhorar a qualidade das hortaliças, em especial no que se refere ao acúmulo de compostos funcionais, que são promotores de saúde (MARTÍNEZ-BALLESTA *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2017). O estresse se configura como aquele capaz de induzir a resposta de defesa das plantas sem

prejudicar seu desenvolvimento morfológico e fisiológico. Este nível pode variar para cada cultura, época do plantio e quantidade de plantas.

Os tratamentos via elicitores fazem com que se desencadeiam a síntese de compostos funcionais em alimentos, como: sementes, grãos, frutas, vegetais e ervas, tornando-se uma alternativa para a indução de alterações fisiológicas nas plantas, estimulando as defesas induzidas pelo estresse. A utilização de estresse abiótico em plantas tem sido relatada em diversas culturas. A exemplo disso, a seca aumentou o conteúdo de carotenoides em trigo (KELES e ÖNCEL, 2002), de tocoferol em plantas de lavanda (MUNNÉ-BOSCH *et al.*, 2001), e de compostos fenólicos em folhas de *Salvia officinalis* L. Em outros vegetais, como o brócolis, se mostrou eficaz a utilização de NaCl (cloreto de sódio) e ácido salicílico como elicitores para o aumento de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais, vitamina C e E (NATELLA *et al.*, 2016). A aplicação de metil jasmonato como elicitor resultou no aumento de compostos bioativos em mirtilos (WANG e ZHENG 2005), bem como o aumento de flavonoides em mirtilos, amoras e maçãs (PERCIVAL e MACKENZIE, 2007; WANG *et al.*, 2008; SHAFID *et al.*, 2011).

Em alface, as aplicações de estresse osmótico não afetaram negativamente o desenvolvimento da planta, e mostra-se um indutor de compostos de defesa com valor nutricional à hortaliça, conforme estudo de Malejane *et al* (2017). Segundo Moreno e Escamilla *et al* (2017), a utilização de estresse hídrico e aplicação de luz UV, aplicados imediatamente antes da colheita, aumenta a qualidade da alface em relação à concentração de compostos funcionais, sem efeitos adversos ao seu crescimento e rendimento. Alguns estudos demonstraram o uso de ácido araquidônico (AA), ácido jasmônico (JA) e ácido abscísico (ABA), como indutores de compostos fenólicos, dentre eles, flavonoides e ácidos fenólicos, além de outros compostos como clorofila, carotenóides e vitamina C em alface (ZŁOTEK; SWIECA e JAKUBCZYK, 2014). Quando aplicada quitosana nas plantas de alface, viabilizou-se o aumento de fenólicos totais (VIACAVA *et al.*, 2018). E a aplicação de um estresse por período de tempo rápido, sob concentrações elevadas de CO<sub>2</sub>, resultou diretamente no acúmulo de compostos fenólicos, como também no aumento da atividade antioxidante de alfaves, sendo benéfico para a saúde

humana o consumo de alimentos tratados com algum tipo de estresse (PÉREZ-LOPÉZ *et al.*, 2018).

Garrido (2014) demonstrou que o aumento no conteúdo de compostos fenólicos e da atividade antioxidante em alfaces cultivadas sobre estresse abiótico é resultado do aumento na síntese desses compostos, o qual é dependente de cada estresse. Sendo assim, faz-se necessária a compreensão de como cada tecido vegetal e rota metabólica é afetada por elicitores específicos. Além disso, é preciso estabelecer a elaboração de protocolos onde se determine a quantidade do aumento destes metabólitos, a fim de produzir alimentos seguros e com qualidade, saudáveis aos consumidores (BAENAS, VIGUERA e MORENO, 2014).

Dentre os elicitores, o uso de estresse por restrição hídrica tem se mostrado de interesse, especialmente levando em consideração a restrição do abastecimento de água em muitos lugares do mundo. Desta forma, adaptar a cultura a esse tipo de condição ambiental é importante para dar continuidade a produção de alimentos em locais de seca (AKINCI e LÖSEL, 2012). Vale salientar que a alface possui em sua composição 96% de água (MYFOODDATA, 2018). Este faz parte de um componente essencial para a sobrevivência da planta (AKINIC *et al.*, 2012). Podendo receber déficits em qualquer momento do seu ciclo de vida (HURD; 1976, LAWBE *et al.*, 2000).

### **3.1.3 Alfaces no Pós-colheita**

Hortaliças de forma geral possuem elevada perecibilidade, observada pela sua rápida deterioração e perda de água, poucos dias após a colheita, fazendo-se necessário o consumo quase imediato das plantas ou a utilização de técnicas de conservação (FINGER *et al.*, 1999). Há diversas técnicas de conservação em alimentos, dentre elas, o uso de atmosfera modificada e atmosfera controlada, e principalmente o uso de refrigeração, atuando na atividade metabólica dos produtos hortícolas, prologando a sua vida de prateleira (MANTILLA *et al.*, 2010).

Um dos fatores mais importante para ser controlado na fase de pós-colheita em produtos hortícolas é a temperatura, influenciando diretamente na qualidade e durabilidade do alimento (WILLS *et al.*; 1998). A alface por suas

características morfológicas onde o principal componente das folhosas é o volume de água, a torna altamente perecível, e sua deterioração se inicia no momento da colheita. Portanto, quanto mais rápido é feito o manejo pós-colheita, a acondicionando em condições de temperaturas mais amenas, maior será seu tempo de conservação. Após a colheita, há o aumento da taxa de reações catabólicas das plantas, levando a perda de água de 5 a 10%, suficiente para causar mudanças na sua estrutura, textura e aparência (ANTONIALI, 2000; CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Chitarra e Chitarra (2005) caracterizam como definição de perda na pós-colheita como qualquer redução na disponibilidade de alimentos para o consumo, que ocorram durante seu manuseio, transporte, armazenamento ou comercialização. A maior problemática encontrada em hortaliças são as perdas por razão da depreciação da qualidade dos produtos, devido à deterioração, causada principalmente por danos físicos e biológicos, tais como: amassamentos, cortes e pela ação de pragas (VILELA *et al.*, 2003).

Para se conseguir uma conservação na pós-colheita, os cuidados devem iniciar já no campo, visando a minimização de danos e contaminações por microrganismos, com uso de métodos adequados. O tipo de transporte até o “packing-house” ou diretamente as redes varejistas deve ser o mais rápido possível e com cuidado, evitando injúrias mecânicas nas plantas não embaladas (CHITARRA e CHITARRA, 1990). Esses cuidados são fundamentais para a preservação da qualidade e, conseqüentemente, estendendo a vida útil da hortaliça. O uso de embalagens adequadas tem o papel de proteção das folhas, permitindo a minimização do manuseio, que, em conjunto com a refrigeração, se mostra essencial para uma melhor conservação pós-colheita de hortaliças. Neste caso, é comum a utilização de polietileno tereftalato (PET) para o acondicionamento de frutas e hortaliças. Em rabanetes, estas embalagens, em conjunto com refrigeração a 5 °C, melhoram a conservação, diminuindo significativamente a perda de massa em minimamente processado (DELAGUILA *et al.*, 2006). Gillies e Toivonen (1995) sugerem a utilização de filme plástico micro-perfurado em conjunto com método de pré-resfriamento para brócolis, estendendo sua vida de prateleira.

A alface tem uma taxa de respiração três vezes mais rápido em temperatura a 10 °C do que a 0 °C e cerca de três vezes mais em temperatura

ambiente (20 °C). Acelerando a respiração, gerando energia na forma de calor, que aumenta concomitante a temperatura (HARDENBURG *et al.*, 1986). A alface tem poucas reservas de substrato (como açúcares e amido) para respirar e produzir a energia mínima necessária para se manter viva (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Tornando-se importante a aplicação de um método de refrigeração visando o aumento da sua estocagem. A temperatura pode atuar minimizando a deterioração das alfaces.

Segundo Ashrae (1998) uma boa condição de armazenamento é a estocagem em temperatura de 0 a 3 °C e em conjunto com alta umidade relativa, conservando a hortaliça de duas a três semanas. Existe uma redução do metabolismo, quando há redução da temperatura de duas a três vezes a cada redução de 10 °C. Reduzir a temperatura reduz os processos enzimáticos, como também a taxa de respiração e a evolução do etileno e, conseqüentemente, age no retardamento dos processos de senescência.

Plantas destinadas ao armazenamento devem estar livres de rupturas nos tecidos, manchas e podridões (MORETTI *et al.*, 2003). Os danos mecânicos desencadeiam uma série de respostas, como aumento temporário da taxa de respiração, produção de etileno que acelera a maturação das folhas e contribui para o amarelecimento do tecido. Em determinados casos, com a ruptura mecânica das membranas expondo a enzimas, levando à síntese de compostos secundários, alterando diretamente na textura, sabor, aparência, aroma e compostos nutritivos (LUENGO e CALBO, 2001; KADER, 2002).

Monaghan *et al* (2016) demonstram que a utilização de déficit hídrico em alfaces ocorrido na pré-colheita levou a formação de plantas menores, porém com maior qualidade e menor probabilidade de serem rejeitadas no mercado pelos consumidores.

Frente ao exposto, verifica-se que a utilização de um estresse nas plantas como forma de incremento de seus compostos de defesa visando a melhoria do seu pós-colheita, é uma estratégia viável em alfaces.

## **4 Material e Métodos**

O experimento foi realizado em casa de vegetação e as demais análises no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (DCTA-FAEM-UFPEL), no Laboratório de Metabolismo Secundário e no Laboratório de Pós-Colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos.

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Cultivo das plantas de alface em condições de estresse hídrico**

As sementes de alface da cultivar 'Veneranda' foram semeadas em bandejas de isopor de 200 células preenchidas com substrato comercial (Carolina Soil) e transplantadas após 20 dias para vasos de 3,5L onde foram cultivadas em casa de vegetação na Universidade Federal de Pelotas – Pelotas – RS. A irrigação foi realizada pelo método gravimétrico, onde os vasos foram pesados após atingirem saturação de 100% (peso inicial) e diariamente foi fornecido o volume de água necessário para manter o peso inicial, conforme sugerido por Catuchi *et al.* (2011).

As plantas foram submetidas a quatro tratamentos: controle (C), onde as plantas foram submetidas ao volume de água correspondente a 100% de saturação; EH 80%, onde as plantas foram submetidas à irrigação equivalente a 80 % da água utilizada no tratamento C; EH 90%, onde as plantas foram submetidas à irrigação equivalente a 90 % da água utilizada no tratamento C; e EH, onde as plantas foram irrigadas da mesma forma que o tratamento C, porém, o suprimento de água foi cessado quatro dias antes da colheita (Tabela 1).

Tabela 1-Tratamentos realizados no presente estudo

Tratamentos	Descrição
C	Controle
EH 80%	Estresse hídrico 80%
EH 90%	Estresse hídrico 90%
EH	Estresse hídrico agudo

Fonte: Autor, 2019.

A aplicação do estresse hídrico iniciou após o estabelecimento das plantas, durante 34 dias consecutivos. O delineamento foi totalmente casualizado com quatro repetições, contendo 10 plantas por repetição, totalizando 80 plantas. Os valores de umidade relativa e temperatura foram monitorados por dataloggers (equipamento de leitura de temperatura e umidade relativa do ar) instalados na casa de vegetação.

Após 34 dias de transplante, 5 plantas por repetição foram colhidas, pesadas em balança analítica e armazenadas a -80 °C para realização das análises correspondentes ao Dia 0 (clorofila, carotenoides, compostos fenólicos totais e individuais, flavonoides e atividade antioxidante).

As demais plantas foram armazenadas em temperatura de refrigeração de 6 °C a 8 °C por 7 dias em BOD (EL222/3/LED/RS, ELETROlab®) e ciclo circadiano de 12 h com umidade relativa do ar de 80 %, para posterior avaliação da qualidade pós-colheita (textura, cor, biomassa, clorofila, carotenoides, compostos fenólicos totais e individuais, flavonoides e atividade antioxidante). Durante o armazenamento foram realizadas duas coletas denominadas de Dia 3 (3 dias armazenadas) e Dia 7 (7 dias armazenadas). As amostras coletadas foram avaliadas quanto aos parâmetros de textura e de cor, conforme descrito a seguir, e posteriormente armazenadas a -80 °C para posterior determinação do conteúdo de clorofilas, carotenoides, compostos fenólicos totais e individuais, flavonoides e atividade antioxidante.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Características físicas das alfaces

Para avaliação da biomassa, as alfaces foram pesadas em balança analítica no momento da colheita, aproximadamente às 9h da manhã. A

porcentagem (%) de massa foi obtida através da média das plantas de cada um dos tratamentos, e expressa em gramas (g).

A análise de textura foi realizada utilizando texturômetro Texture TAXT2 Plus (Stable Micro Systems, Inglaterra), pelo método TPA, calibrado com 5 kg de carga. As folhas de alfaces foram cortadas individualmente em dez locais diferentes da folha com lâmina de guilhotina. Com velocidade de pré-teste, teste e pós-teste de 5, 1,5 e 5 mm/s, respectivamente, com distância de penetração de 50 mm. Os resultados foram expressos em Newton (N), representando a média dos dez cortes da folha.

A cor das amostras foi determinada utilizando colorímetro (CR300, Minolta Chromamater), através do sistema de cor CIELab. Os parâmetros avaliados foram L, a\* e b\*, nos quais L (luminosidade) varia de preto (0) a branco (100), e os parâmetros a\* e b\* foram utilizados para calcular o ângulo Hue ( $^{\circ}\text{Hue} = \tan^{-1} b^*/a^*$ ), o qual indica a cor observada.

#### **4.2.2 Clorofila e Carotenoides totais**

A quantificação de clorofila e carotenoides foi realizada conforme descrito por Zlotek (2014). A extração foi realizada a partir de folhas liofilizadas (0,05 g) com 2 mL de acetona a 80 % (v/v) à 4 °C. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 13.000 g durante 5 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação do conteúdo de clorofila a (chl a), clorofila b (chl b) e carotenoides, através da leitura em espectrofotômetro, nos respectivos comprimentos de onda de 663, 645 e 470 nm. As concentrações foram determinadas de acordo com as equações a seguir e expressas em µg/g em peso seco:

$$\text{Chl a} = 12,72 A_{663} - 2,59 A_{645}$$

$$\text{Chl b} = 22,88 A_{645} - 4,67 A_{663}$$

$$\text{Car} = (1000 A_{470} - 3,27 \text{ chl a} - 104 \text{ chl b}) / 229.$$

#### **4.2.3 Compostos fenólicos totais**

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado segundo Singleton Rossi (1965) e Swain & Hillis (1959). Para extração foram pesadas 2 g de amostra, as quais foram diluídas em 20mL de metanol P.A. e agitadas em Ultra-turax (T18, IKA) a 12.000 rpm, durante 1 min. Posteriormente, o extrato foi

centrifugado (Centrifuge RC5C, Sorvall Instruments) por 15min a 6.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido para novos tubos falcon e armazenado em freezer a -20 °C. A quantificação foi realizada em microplaca. Para a reação, adicionou-se 15µL do extrato, 120µL de água destilada, 15µL de Folin Ciocalteau 0,25 N, agitou-se manualmente por 10seg e deixou-se no escuro durante 3min para que ocorresse a reação. Após, adicionou-se 30µL de NaCO<sub>2</sub> e deixou-se por 2 h no escuro. Realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro (Spectra Max® 190) no comprimento de onda de 725nm. O conteúdo fenólico foi expresso como equivalentes de ácido gálico (mg GAE. 100g<sup>-1</sup>), de acordo com a equação linear da curva padrão de calibração de ácido gálico. A equação da curva de calibração foi,  $y = 0,0026x - 0,0064$ ,  $R^2 = 0,9968$  onde "y" é a absorbância e "x" é a concentração como equivalentes de ácido gálico.

#### 4.2.4 Flavonoides totais

A determinação dos flavonoides foi realizada conforme método descrito por ZHISHEN *et al.* (1999), com adaptações. Para extração, foram pesadas 2g de amostra, as quais foram diluídas em 20mL de metanol P.A. e agitadas em Ultra-turax (T18, IKA) a 12.000rpm, durante 1min. Posteriormente, o extrato foi centrifugado (Centrifuge RC5C, Sorvall Instruments) por 15min a 6.000rpm. O sobrenadante foi recolhido para novos tubos falcon e armazenado em freezer a -20 °C. A quantificação foi realizada em microplaca. Para a reação, adicionou-se 120 µL de água destilada, 30µL do extrato, agitou-se manualmente por 10seg e adicionou-se 9µL de NaNO<sub>2</sub> 10%. Agitou-se manualmente por mais 10seg e deixou-se acontecer a reação no escuro durante 5min. Adicionou-se 9µL de AlCl<sub>3</sub> e agitou-se por 10seg e aguardou a reação por 6min. Após, adicionou-se 60µL de NaOH 1M e 72µL de água destilada. Realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro (Spectra Max® 190) no comprimento de onda de 510nm. Os flavonoides foram quantificados através da curva de calibração de catequina e os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina 100g<sup>-1</sup> de amostra seca. A equação da curva de calibração foi  $y = 0,0024x + 0,0064$   $R^2 = 0,9969$ , onde "y" é a absorbância e "x" é a concentração como equivalentes de catequina.

#### 4.2.5 Atividade Antioxidante

Para determinar o potencial antioxidante seguiu-se o método de BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, (1995), adaptado utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Preparou-se uma solução estoque de DPPH (24 mg de DPPH em 100mL de metanol). Preparou-se uma solução diluída adicionando 10mL da solução concentrada em 45mL de metanol P.A. A absorvância da solução de trabalho foi ajustada para  $1,100 \pm 0,02\text{nm}$ . Para a reação utilizou-se 100 $\mu\text{L}$  do extrato preparado para os compostos fenólicos totais e 3,9mL da solução diluída. Após, deixou-se reagir por 30min no escuro. A leitura da absorvância foi realizada no comprimento de onda de 517nm em espectrofotômetro (6705 UV/Vis., Jenway®). Metanol foi usado como branco. O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo da porcentagem de inibição da captação de radicais livres pelo DPPH seguiu a equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100]}{\text{Abs}_{\text{branco}}}$$

#### 4.2.4 Análise cromatográfica por HPLC-MS

##### 4.2.4.1 Compostos fenólicos individuais

A análise de compostos fenólicos foi realizada de acordo com método proposto por Hoffmann *et al.* (2018).

##### Preparo dos Extratos

A extração foi realizada da seguinte forma: foram pesados cinquenta miligramas de amostra liofilizada, adicionou-se 1000 $\mu\text{L}$  de metanol (75%) acidificado com 0,1% de ácido fórmico, agitado em vortex por 10seg, após colocado em banho ultrassônico por 15min e centrifugado a 9.900rpm por 15min a 25 °C (centrifuge 5430 R, eppendorf®). O sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi extraído novamente repetindo os passos anteriores. Os sobrenadantes foram combinados e homogeneizados. A uma alíquota de 100 $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes foi adicionado 2 $\mu\text{L}$  de reserpina (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; padrão interno), filtrados em filtro de seringa de nylon (0,22 $\mu\text{M}$ ) e transferido para vials para posterior injeção.

### **Instrumentação e condições analíticas**

Dez microlitros do extrato hidroalcoólico foram injetados em cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de voo) (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A coluna utilizada foi Bidentate C18 (USA). Como fase móvel utilizou-se solução de água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). O fluxo foi de 0,2 mL min<sup>-1</sup> e a temperatura da coluna de 40°C. Para a separação utilizou-se um gradiente: iniciou-se em 5% B e aumentou-se linearmente para 90% B aos 15min, quando manteve-se nesta condição por 3 min; então, retornou-se a 5% de B em 2min e foi mantido a 5% B por mais 6min.

O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização negativo com espectros adquiridos na faixa de massa de  $m/z$  50 a 1200. Os parâmetros de capilaridade foram: voltagem do capilar em 3,5 kV, gás de secagem em 8,0 L min<sup>-1</sup> e temperatura de 180 °C, colisão de RF de 500 Vpp, tempo de transferência 120ms e armazenamento pré-pulso de 8µS, o gás de nebulização (N<sub>2</sub>) com pressão de 2 bar. A calibração do equipamento foi realizada com formiato de sódio 10mM.

Os dados de MS e MS/MS foram processados utilizando o software *Data analysis* 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), que fornece uma lista de possíveis fórmulas elementares usando a ferramenta Smart Formula (Bruker Compass DataAnalysis). A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos valores de  $m/z$ , espectro de massa e padrões de fragmentação obtidos com literatura de referência (Agusti *et al.*, 2011; Garrido *et al.*, 2016), e bases de dados online (METLIN, KEGG, PubChem, FooDB e ReSpect) com uma janela de precisão de massa de 5ppm. A identificação dos compostos de catequina e do ácido caféico foi confirmada com padrões externo (Sigma-Aldrich). Para análise quantitativa, uma curva de calibração para cada um dos padrões fenólico disponível foi construída. Para os compostos fenólicos identificados para os quais os padrões comerciais não estavam disponíveis, seu conteúdo foi estimado usando as curvas analíticas de compostos semelhantes. Os resultados foram expressos em µg/g.

#### **4.4 Análise estatística**

Os experimentos foram realizados em delineamento casualizado. Para determinar as significâncias das diferenças realizou-se a análise de variância ANOVA e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). A análise estatística foi realizada utilizando o programa Statistica 8.0 (Stat Soft. Inc., USA).

## 5 Resultados

### 5.1. Efeito do estresse hídrico em parâmetros de qualidade (massa, textura, cor)

A aplicação dos tratamentos EH 90% e EH resultou em alfaces com biomassa estatisticamente superior às dos tratamentos C e EH 80%, demonstrando que o estresse hídrico, nos níveis testados, não afeta negativamente o rendimento das plantas, sendo, portanto, uma estratégia interessante para o cultivo de alfaces (Figura 5 e Figura 6).

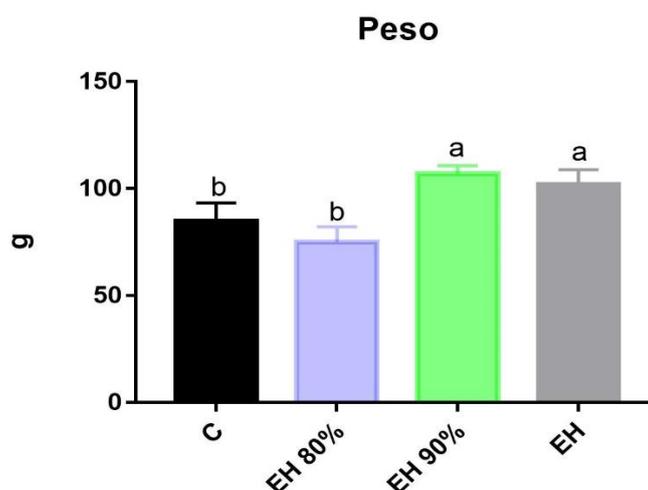


Figura 5 - Biomassa de alfaces submetidos a estresse hídrico. C: controle, EH 80%: Estresse hídrico 80%, EH 90%: Estresse hídrico 90% e EH: Estresse hídrico agudo. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

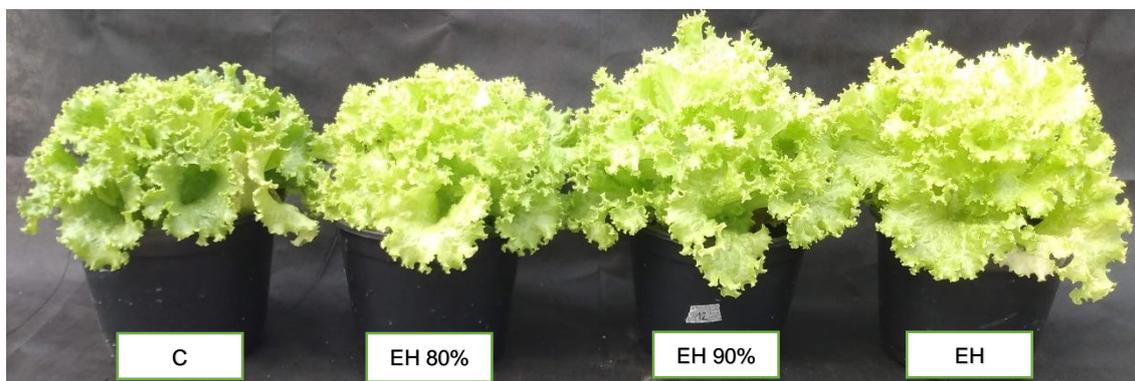


Figura 6 - Características fenotípicas de alfaces submetidos a estresse hídrico. C: controle, EH 80%: Estresse hídrico 80%, EH 90%: Estresse hídrico 90% e EH: Estresse hídrico agudo.

A firmeza e a coloração das folhas de alface não diferiram entre os tratamentos no momento da colheita, e não foram afetadas pelo

armazenamento, conforme apresentado nas Tabelas 2 (firmeza), 3 (cor) e Figura 7 (fotodocumentação do último dia de armazenamento).

Tabela 2- Firmeza de folhas de alface submetidas a estresse hídrico e armazenadas durante sete dias a 4 °C e 80% de umidade relativa.

Tratamentos	Dias pós-armazenamento		
	Dia 0	Dia 3	Dia 7
Controle	38,76 ±8,41ns	38,76 ±8,01ns	39,30 ±4,69ns
EH 80%	43,26 ±8,67ns	38,70 ±8,20ns	40,99 ±8,95ns
EH 90%	44,45 ±8,19ns	46,45 ±4,46ns	46,46 ±7,34ns
EH	43,29 ±10,36ns	47,72 ±12,32ns	37,40 ±6,86ns

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ns: não significativo. C: controle, EH 80%: Estresse hídrico 80%, EH 90%: Estresse hídrico 90% e EH: Estresse hídrico agudo.



Figura 7- Características fenotípicas da pós-colheita (último dia de armazenamento) alfaces submetidos a estresse hídrico. C: controle, EH 80%: Estresse hídrico 80%, EH 90%: Estresse hídrico 90% e EH: Estresse hídrico agudo. Fonte: Autor, 2020.

Porém, a coloração foi afetada pelo armazenamento: o parâmetro L+ se mostrou superior no tratamento EH90% e inferior no tratamento EH no Dia 3, comparado ao Dia 0; o parâmetro A- se mostrou superior no tratamento C, nos Dias 3 e 7, comparado ao Dia 0; enquanto que o parâmetro B foi afetado positivamente no Dia 3 no tratamento EH 80% e no Dia 7 nos tratamentos C, EH 80% e EH 90%. Apesar disso, o ângulo Hue não foi afetado pelo armazenamento.

Tabela 3- Coloração das folhas de alface submetidas a estresse hídrico e armazenadas durante sete dias a 4 °C e 80% de umidade relativa.

Tratamentos	L	A -	B	°Hue
Dia 0				
Controle	62,37 ±1,92ns	-18,01 ±2,14ns	33,37 ±2,54ns	47,19 ±2,19ns
EH 80%	58,83 ±4,13ns	-18,62 ±1,22ns	32,48 ±1,54ns	45,94 ±5,54ns
EH 90%	63,02 ±2,30ns	-17,11 ±1,44ns	32,58 ±1,21ns	46,07 ±2,70ns
EH	61,95 ±2,28ns	-17,96 ±1,68ns	33,32 ±1,32ns	47,13 ±3,74ns
Dia 3				
Controle	65,02 ±2,85ns	-20,89 ±0,79ns	34,94 ±1,99ns	49,41 ±5,07ns
EH 80%	56,16 ±6,79ns	-21,33 ±0,70ns	32,96 ±2,81ns	46,61 ±6,54ns
EH 90%	67,83 ±1,15ns*	-20,91 ±0,60ns	36,76 ±0,71ns	51,99 ±4,43ns
EH	60,92 ±3,99ns*	-19,59 ±5,44ns	35,03 ±1,68ns	49,54 ±5,86ns
Dia 7				
Controle	58,77 ±1,59ns	-19,76 ±0,61ns*	33,60 ±1,10ns*	47,52 ±5,38ns
EH 80%	61,18 ±1,69ns	-22,01 ±0,76ns	36,01 ±1,48ns*	50,93 ±7,14ns
EH 90%	60,46 ±0,91ns	-19,00 ±3,47ns	34,26 ±0,99ns*	48,46 ±3,07ns
EH	58,84 ±1,09ns	-21,75 ±1,20ns	37,14 ±1,63ns	52,53 ±4,39ns

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ns: não significativo. C: controle, EH 80%: Estresse hídrico 80%, EH 90%: Estresse hídrico 90% e EH: Estresse hídrico agudo. O asterisco (\*) indica diferença estatística entre os dias de armazenamento, para o mesmo composto, comparados ao Dia 0.

### 5.1.2 Efeito do estresse hídrico em parâmetros de qualidade funcional

De acordo com a Figura 8, a aplicação de estresse hídrico no nível de 80 % (EH 80) resultou em plantas com maior conteúdo de carotenoides ( $2,74 \mu\text{g g}^{-1}$ ), comparado aos demais tratamentos. Após 3 dias de armazenamento, o tratamento controle apresentou maior concentração ( $2,46 \mu\text{g g}^{-1}$ ), comparado ao tratamento EH 90%, enquanto que os demais tratamentos não diferiram entre si; e após 7 dias de armazenamento, foram observados resultados similares aos do Dia 0, onde o tratamento EH 80% se destaca, com concentração de carotenoide superior aos demais tratamentos ( $2,76 \mu\text{g g}^{-1}$ ), exceto o tratamento EH 90%, do qual não diferiu estatisticamente. De forma similar, o tratamento EH 80% apresentou conteúdo superior de clorofilas totais no momento da colheita, comparado aos tratamentos EH 90% e EH (EH 80%:  $15,69 \mu\text{g g}^{-1}$ ; C:  $13,82 \mu\text{g g}^{-1}$ ; EH 90%:  $12,65 \mu\text{g g}^{-1}$ ; EH:  $11,50 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Após 3 dias de armazenamento, o estresse que apresentou maior conteúdo de clorofilas totais foi o EH 80% ( $16,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ) comparado com os demais (C:  $13,50 \mu\text{g g}^{-1}$ ; EH 90%:  $10,91 \mu\text{g g}^{-1}$ ; EH:

11,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ ). E no último dia de armazenamento (Dia 7), o estresse hídrico de EH 80% permaneceu com conteúdo superior (18,24 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) ao do controle, o qual não diferiu dos demais tratamentos.

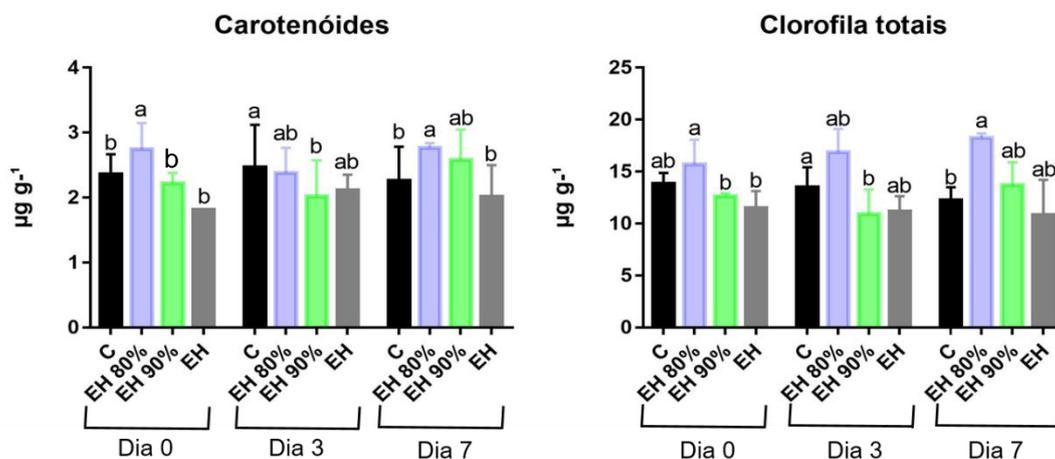


Figura 8- Conteúdo de carotenoides e clorofilas totais em folhas de alfaces submetidos a estresse hídrico C: controle, EH 80%: Estresse hídrico 80%, EH 90%: Estresse hídrico 90% e EH: Estresse hídrico agudo. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Com relação aos flavonoides totais, apenas após 7 dias de armazenamento é possível observar diferença significativa entre os tratamentos, sendo o tratamento EH80% superior aos demais tratamentos (10  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) que não diferiram entre si (C: 83  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; EH90%: 82  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; EH: 82  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). O conteúdo destes compostos foi afetado pelo armazenamento apenas no tratamento EH, o qual apresentou valores menores no Dia 3, comparados ao Dia 0. Por outro lado, o conteúdo de compostos fenólicos totais se mostrou inferior no tratamento EH80% comparado aos demais, no Dia 0; comparado aos tratamentos C e EH, no Dia 3; e comparado ao tratamento EH, no Dia 7, não sendo afetado pelo armazenamento em nenhum dos tratamentos (Figura 9). Estes resultados sugerem que o tratamento EH80% favorece a indução de compostos flavonoides em detrimento de compostos fenólicos totais.

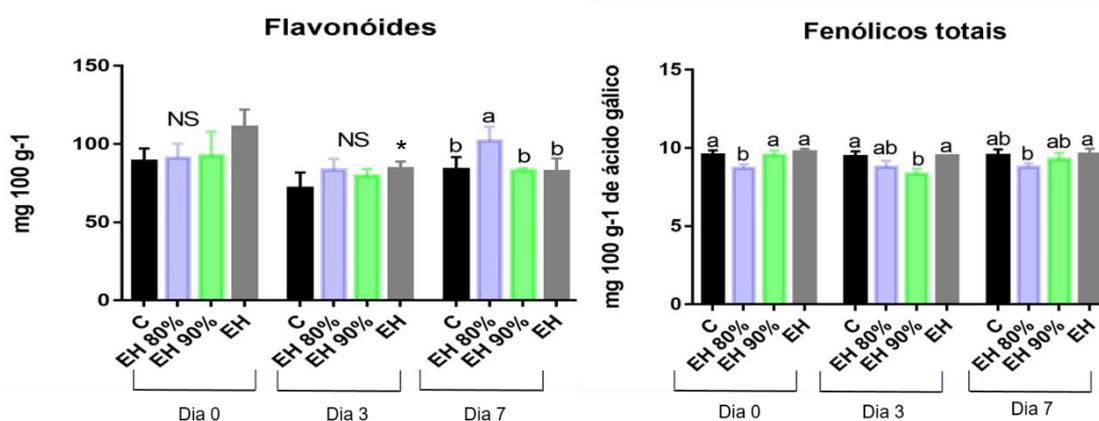


Figura 9-Conteúdo de flavonoides e compostos fenólicos totais em folhas de alfaces submetidas a estresse hídrico. C: controle, EH80%: Estresse hídrico 80%, EH90%: Estresse hídrico 90% e EH: Estresse hídrico agudo. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais no mesmo gráfico, e no mesmo dia de coleta, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). NS: não significativo. O asterisco (\*) indica diferença estatística entre os dias de armazenamento, para o mesmo composto, comparado ao Dia 0.

De acordo com a Figura 10, o tratamento EH80% apresentou atividade antioxidante superior aos demais tratamentos, no Dia 0, e superior ao controle no Dia 3. Sendo que os tratamentos não diferiram entre si no Dia 7 pós-armazenamento. Esta análise também não foi afetada pelo armazenamento em nenhum dos tratamentos.

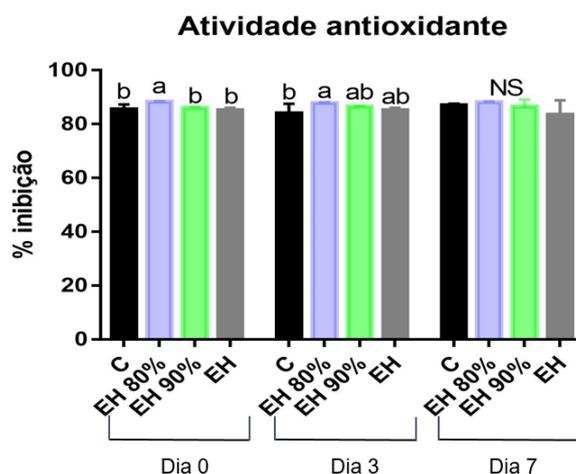


Figura 10-Atividade antioxidante em folhas de alfaces submetidas a estresse hídrico. C: controle, EH 80%: Estresse hídrico 80%, EH 90%: Estresse hídrico 90% e EH: Estresse hídrico agudo. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1.2.1 Compostos fenólicos individuais

Neste estudo foram identificados e quantificados nove compostos fenólicos em alface ‘Veneranda’, conforme mostra a Tabela 4, a qual incluir tempo de retenção do composto, fórmula molecular,  $m/z$  experimental e teórico, erro e mSigma. Entre os ácidos fenólicos, encontram-se os derivados do ácido hidrocinnâmico ácido caféico,  $m/z$ : 179,035 [M-H]<sup>-</sup>; ácido 1-cafeoilquínico  $m/z$ : 353,0878 [M-H]<sup>-</sup>; ácido 2-cafeoilquínico  $m/z$ : 353,0878 [M-H]<sup>-</sup>; ácido 5-p coumaroilquínico  $m/z$ : 337,0929 [M-H]<sup>-</sup> e ácido 3,5-dicafeoilquínico  $m/z$ : 515,1195 [M-H]<sup>-</sup>; ácido monocaffeoyl tartárico  $m/z$ : 311,0409 [M-H]<sup>-</sup> e ácido p-coumaroyltartárico  $m/z$ : 295,0459 [M-H]<sup>-</sup>. No grupo dos flavonoides, foram identificadas duas quercetinas (malencil quercetina malonilglucósido  $m/z$ : 549,0886 [M-H]<sup>-</sup> e quercetina 3-O-glucuronida  $m/z$ : 477,0675 [M-H]<sup>-</sup>).

Tabela 4- Compostos fenólicos identificados por LC-MS/MS em alfaces submetida ao estresse hídrico.

Identificação	TR [min]	Fórmula Molecular	$m/z$ Experimental	$m/z$ Teórica	Erro (ppm)	MSigma
Ácido caféico	3,11	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179,035	179,0341	5	4,6
Ácido 1-cafeoilquínico	4,79	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	353,0878	353,0867	3,1	1
Ácido 2-cafeoilquínico	9,7	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	353,0878	353,0875	0,3	0,9
Ácido 5-p coumaroilquínico	7,2	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	337,0929	337,0946	-1,7	22,9
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	9,76	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	515,1195	515,118	2,8	30,2
Ácido p-coumaroyltartárico	6,43	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub>	295,0459	295,0451	2,7	21,6
Ácido monocaffeoyl tartárico	3,34	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>9</sub>	311,0409	311,0398	3,2	9,2
Quercetina malonilglucósido	9,34	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> O <sub>15</sub>	549,0886	549,0891	-0,8	1
Quercetina 3-O-glucuronida	8,64	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>13</sub>	477,0675	477,0672	0,6	26,2

TR - tempo de retenção

mSigma - semelhança de perfil isotópico – quanto menor o valor maior à similaridade

A quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de alfaces tratadas com estresse hídrico está apresentada na Figura 13, os cromatogramas nas

Figuras 12 e Figura 13. Dentre os compostos fenólicos identificados, o ácido monocaffeoyl tartárico e o ácido caféico foram os compostos encontrados em maior abundância. De modo geral, o conteúdo destes compostos foi afetado pelos tratamentos. O tratamento EH 80% apresentou conteúdo superior de ácido caféico e ácido monocaffeoyl tartárico nas 3 coletas (Dias 0, 3 e 7) em relação aos demais tratamentos (exceto o conteúdo de ácido caféico em relação ao tratamento EH 90%, no Dia 3); e dos flavonoides quercetina malonilglucósido e quercetina-3-O-glucuronida, em relação aos demais tratamentos no Dia 0 e em relação ao tratamento C no Dia 3. Por outro lado, valores superiores de ácido 5-p-coumaroilquínico foram observados no tratamento EH no Dia 0, em relação ao tratamento EH 80% e em relação a todos os demais tratamentos no Dia 7. Com relação ao ácido 1-cafeoilquínico, foram observados valores superiores nos tratamentos C e EH durante o Dia 0, não havendo diferença estatística nos demais dias de pós-armazenamento. De foram similares, o ácido 2-cafeioquínico se mostrou estatisticamente superior no tratamento C em relação ao EH 90% no Dia 0, e o conteúdo de ácido 3,5-dicafeicoquínico se mostrou estatisticamente superior no tratamento C em relação ao EH 80% e ao EH 90% no Dia 0, não diferindo entre nenhum tratamento nos demais dias.

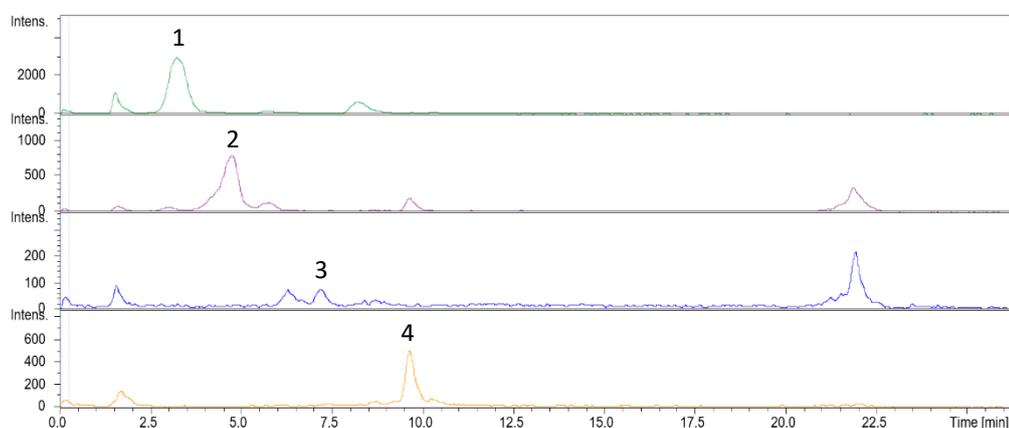
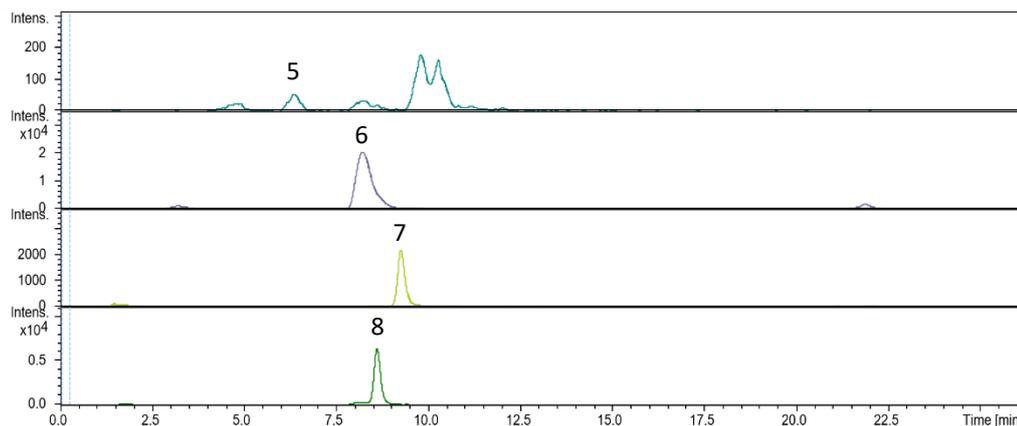


Figura 11 – Cromatograma dos compostos fenólicos individuais em alfaces sob estresse hídrico. 1: Ácido caféico 2: ácido cafeoilquínico 3: Ácido 5-p-coumaroilquínico 4: ácido 3,5-dicafeoilquínico.



*Figura 12 – Cromatograma dos compostos fenólicos individuais em alfaces sob estresse hídrico. 5: ácido p-coumaroyltartárico 6: Ácido monocaffeoyl tartárico 7: Quercetina malonilglucósido 8: Quercetina 3-O-glucuronida.*

Conforme observado na Figura 13, o armazenamento afetou negativamente diversos compostos fenólicos individuais. Alfaces do tratamento controle (C) apresentaram conteúdo reduzido de ácido caféico, quercetina 3-O-glucuronida e ácido 3,5-dicafeyloquínico no Dia 7, e dos ácidos monocaffeoyl tartárico, ácido 5-p-coumaroilquínico e ácido 2-cafeioquínico nos Dias 3 e 7. Por outro lado, o tratamento EH 80% apresentou redução apenas dos compostos 5-p-coumaroilquínico no Dia 7 e quercetina malonilglucósido nos dois dias de armazenamento. De forma similar, o tratamento EH 90% apresentou redução apenas de ácido p-coumaroyltartárico nos dois dias de armazenamento e o tratamento EH mostrou conteúdo inferior de ácido 5-p-coumaroilquínico no Dia 3, ácido caféico no Dia 7, e ácido 3,5-dicafeyloquínico nos dois dias de armazenamento. Além disso, alguns compostos foram induzidos durante o armazenamento. No tratamento C, o ácido caféico e a quercetina-3-O-glucuronida apresentaram valores maiores nos Dia 7 em relação ao Dia 0, e o ácido p-coumaroyltartárico nos Dias 3 e 7; e no tratamento EH, o composto quercetina malonilglucósido apresentou valores superiores no Dia 7 e o composto quercetina-3-O-glucuronida no Dia 3, comparados ao Dia 0. Estes resultados sugerem que o armazenamento afeta o conteúdo de compostos fenólicos e que os estresses utilizados, em maior ou menor grau, influenciam no efeito do armazenamento.

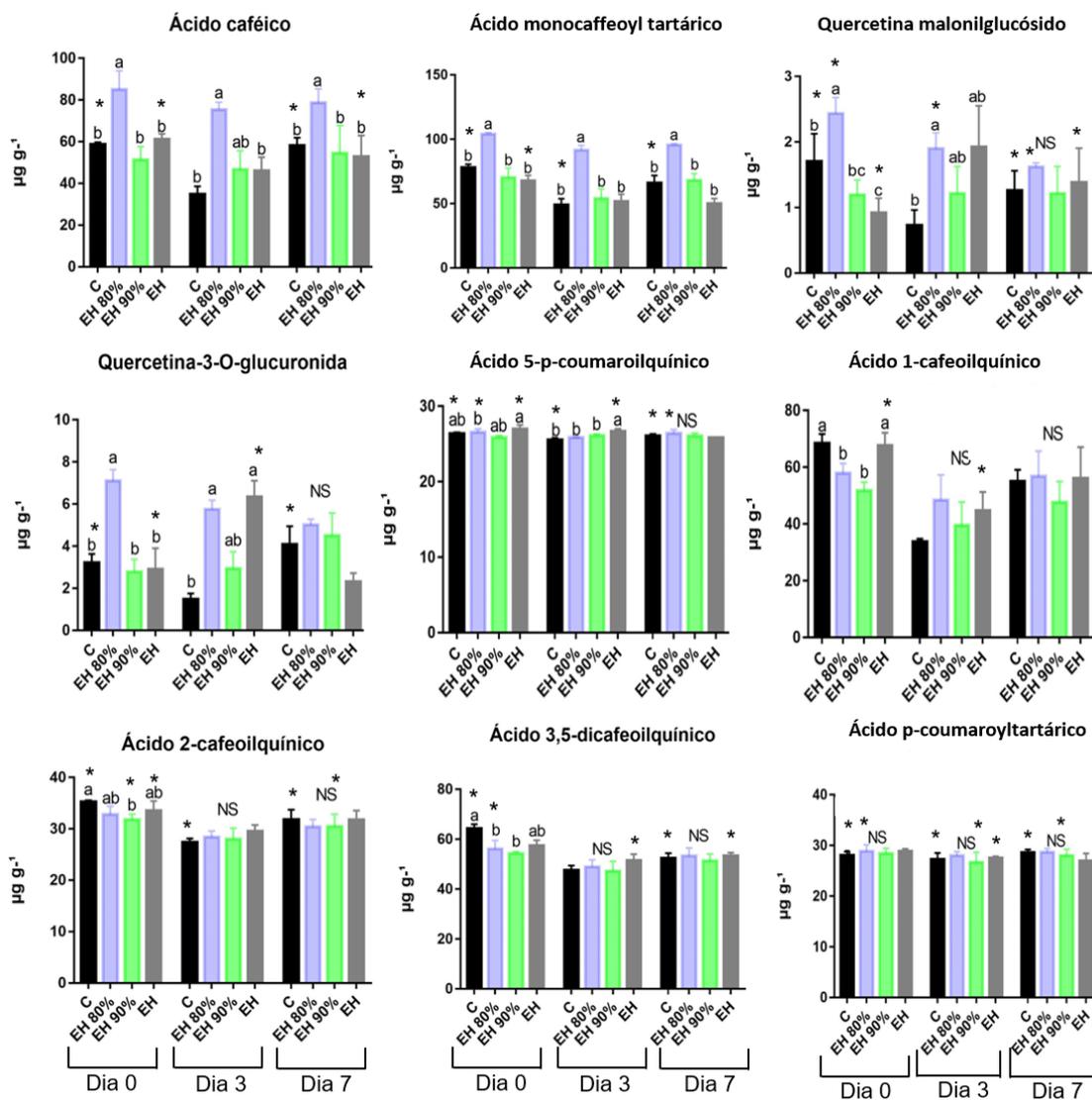


Figura 13- Conteúdo de compostos fenólicos em folhas de alfaces submetidos a estresse hídrico. C: controle, EH 80%: Estresse hídrico 80%, EH 90%: Estresse hídrico 90% e EH: Estresse hídrico agudo. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). O asterisco (\*) indica diferença estatística entre os dias de armazenamento, para o mesmo composto, comparado ao Dia 0.

## 6 Discussão

*A aplicação de estresse hídrico resulta em plantas de alface com maior produtividade e qualidade nutricional e funcional*

A aplicação de elicitores abióticos, a exemplo do estresse hídrico tem sido uma estratégia avaliada em diversos estudos, visando o incremento na produtividade e qualidade de culturas agrícolas (THAKUR et al., 2018). Neste estudo, foram testadas duas doses de estresse hídrico (EH 80% e EH 90%) aplicados ao longo do desenvolvimento das plantas de alface, além de um tratamento com estresse hídrico agudo (EH), onde a irrigação foi suspensa quatro dias antes da colheita.

Nenhum dos estresses utilizados resultou em efeitos negativos à produtividade da cultura (Figura 5) ou ao fenótipo em geral das plantas (Figura 6), mostrando não se tratar de estresses severos. Estes resultados também indicam que a variedade 'Veneranda' apresenta capacidade de tolerar os níveis de estresse aplicados. De fato, a tolerância ao déficit hídrico é determinada por caracteres genéticos, variando de acordo com a variedade. A exemplo disso, Eriksen *et al.* (2016) relatam que em alguns cultivares de alface o estresse por restrição hídrica promove aumento na biomassa. Hernández *et al.* (2019) relata que as respostas das plantas para lidar com o estresse são acionadas após o reconhecimento de uma variedade de estressores biológicos, químicos e físicos, sendo que pequenas doses estressoras podem causar efeitos positivos no desempenho da planta, enquanto que altas doses provocam efeitos negativos. De acordo com estudo realizado por Sorrentino *et al.* (2020), o desempenho de crescimento das cultivares 'Aquino' e 'Barlach' foi rapidamente comprometido sob estresse hídrico; no entanto, 'Barlach' cresceu melhor e resultou em maior biomassa nas condições controle e de estresse em comparação com 'Aquino'. Desta forma, se faz necessário determinar as doses de estresse adequadas de acordo com a variedade estudada.

Em condições de déficit hídrico o potencial hídrico das células é reduzido e os estômatos foliares se fecham, reduzindo a transpiração. Apesar de reduzir a perda de água, o fechamento estomático evita a entrada de CO<sub>2</sub>, afetando negativamente as taxas fotossintéticas (TAIZ; ZEIGER, 2017). Desta forma,

níveis severos de déficit hídrico normalmente resultam em prejuízo no crescimento e desenvolvimento vegetal, acarretando perda da produtividade. No entanto, conforme apontado por Erickson *et al* (2017), os efeitos do déficit hídrico no rendimento das culturas têm uma forte interação com o momento do estresse, relacionado ao estágio de crescimento da planta e à severidade do estresse. A exemplo disso, a aplicação de um período de estresse hídrico agudo e relativamente curto durante o crescimento vegetativo do sorgo levou a alterações na função das plantas, principalmente na partição de recursos entre raiz e parte aérea, o que resultou em maior produtividade de grãos. Desta forma, o uso de um estresse agudo curto, aplicado apenas no final do desenvolvimento da planta poderia ser uma estratégia interessante. Interessantemente, o tratamento EH afetou positivamente a biomassa vegetal, sugerindo que a utilização deste estresse é uma estratégia eficaz para o incremento da produção dessa folhosa.

De forma similar, a aplicação de EH 90% resultou em ganho na biomassa de alface. Diversos estudos têm mostrado que a aplicação de estresses pode promover o crescimento vegetal. A este efeito tem sido cunhado o termo “hormese”, que seria a resposta adaptativa a baixos níveis de estresses ou danos, resultando em melhor adaptação a algumas condições fisiológicas (WIEGANT, POOT, BOERS-TRILLES, & SCHREIJ, 2013). Segundo Vázquez-Hernández *et al* (2019) a resposta ao estresse é bifásica, na qual em altas doses pode ser tóxico, por causar inibição de compostos nas plantas, enquanto em baixas doses pode promover um efeito bioestimulante. Estes estresses desencadeiam respostas de defesa induzidas pelas plantas, proporcionando assim uma resistência a outras adversidades que as acometem, o que pode justificar o aumento de biomassa observado neste estudo.

Outra característica interessante observada foi que, apesar de terem recebido um regime menor de água durante seu cultivo, a firmeza das plantas de alface não foi afetada por nenhum dos estresses, confirmando se tratar de níveis baixos de estresse, e que as plantas foram capazes de evitar a perda de água. De forma similar, a coloração (Tabela 3) não foi afetada por nenhum dos tratamentos; porém, os níveis de carotenoides e clorofila (Figura 8), que são relevantes para a eficiência fotossintética e determinam a cor em alfaces, foram afetados positivamente no tratamento EH80%. Cassetari *et al* (2015)

demonstraram que existe uma correlação entre a concentração de carotenoides e de clorofila em alface, corroborando com os resultados observados neste estudo. As clorofilas são pigmentos fotossintéticos que fazem parte de um conjunto de reações químicas presente nas plantas, formando complexos derivados da porfirina, contendo um átomo central de magnésio. Curiosamente, o aumento no acúmulo destes pigmentos não se traduziu em aumento na biomassa, sugerindo que a atividade fotossintética não tenha sido acelerada neste tratamento.

Além da atuação na fotossíntese nas plantas, os carotenoides têm sido relatados como benéficos à saúde humana quando ingeridos na dieta. Estes compostos incluem precursores de vitamina A, como o  $\beta$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina, e compostos não provitamina A, como a luteína e o licopeno. Os pro-vitamina A tem sido associados à prevenção de câncer, doenças cardíacas, a hipovitaminose A, que pode acarretar em cegueira, dentre outras (BOROWSKI, 2015; CASSETARI, 2012; UENOJO *et al.*, 2007); enquanto que a luteína tem a capacidade de dissipar a energia dos radicais livres e sequestrar oxigênio livre, protegendo moléculas de lipídeos, membranas proteicas, lipoproteínas de baixa densidade, proteínas e DNA contra os radicais, agindo com efeito protetor das células contra diversas doenças (STRINGHETA *et al.*, 2006). Já o licopeno que possui o mesmo efeito protetor contra os radicais livres, é reconhecido pelo potencial antioxidante, anticancerígeno e antiteratogênico (DUTRA; NETO; MORAIS, 1989). Assim, a aplicação do tratamento EH 80% se mostra importante sob o ponto de vista nutricional/funcional.

A aplicação do tratamento EH 80% também resultou em aumento na atividade antioxidante total (Figura 10), a qual pode estar associada com o aumento no conteúdo dos carotenoides, visto que alguns deles apresentam esta propriedade, e no aumento no conteúdo de alguns compostos fenólicos individuais (Figura 13), embora o conteúdo total de compostos fenólicos neste tratamento tenha sido afetado negativamente, comparado aos demais tratamentos (Figura 9). Cabe salientar que existem outros componentes não-enzimáticos do sistema de defesa das plantas, com ação antioxidante, como o

ascorbato, a glutatona, o tocoferol, os quais não foram quantificados no presente estudo.

Embora o conteúdo de compostos fenólicos totais ser menor no estresse hídrico EH 80% comparado ao controle (Figura 13), ao utilizar uma tecnologia mais precisa como LC-MS/MS, utilizando curva de calibração dos compostos foi possível observar que o ácido caféico, ácido monocaffeoyl tartárico, quercetina malonilglucósido, e a quercitina-3-O-glucuronida foram induzidos neste tratamento. O aumento do conteúdo de ácido caféico, que é considerado o antioxidante mais potente dos derivados do ácido hidroxicinâmico, juntamente com o aumento de ácido monocaffeoyl tartárico nas folhas de alface deste tratamento representam um ganho na qualidade funcional deste alimento. Estes compostos têm características relevantes para a saúde, contribuindo para o aumento da produção de colágeno, prevenindo o envelhecimento precoce e possuem ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral (AGUSTÍ *et al.*, 2011; MAGNANI *et al.*, 2014). Já os flavonoides quercetina malonilglucósido e quercitina-3-o-glucuronida, destacam-se pelo potencial antioxidante, anticarcinogênicos, efeitos protetores do sistema renal, cardiovascular e hepático (BEHLING; SENDÃO, 2004). Juntos, estes resultados indicam que a aplicação de estresse hídrico, especialmente no nível de 80%, em alface representa uma estratégia interessante para melhorar a qualidade desta hortaliça.

#### *A aplicação de estresse hídrico no pré-colheita afeta a qualidade pós-colheita de alface*

Diversos estudos têm mostrado que a aplicação de estresses pode contribuir para uma melhor tolerância da planta a estresses subsequentes. A esta estratégia tem sido utilizada o termo 'priming'. Por este motivo, no presente estudo avaliamos o efeito da aplicação pré-colheita de estresse hídrico na qualidade de alfaces submetidas ao armazenamento no período pós-colheita (BRUCA *et al.*, 2007; SAVVIDES *et al.*, 2016). A firmeza das folhas se manteve similar durante o armazenamento em todos os tratamentos, possivelmente por este ter ocorrido em ambiente com alta umidade relativa do ar (80%). Por outro lado, alguns parâmetros de coloração foram afetados pelo armazenamento,

dependendo do tratamento. Essa análise influencia diretamente na qualidade visual das hortaliças, pois o consumidor prefere folhosas de aparência vibrante (MELO; MELO; SILVA, 2014). Porém, não se observou nenhum efeito claro dos estresses na preservação pós-colheita deste parâmetro. Além disso, o armazenamento não afetou o conteúdo de carotenoides ou de clorofilas em nenhum dos tratamentos, os quais estão associados com a coloração das folhas, sendo o conteúdo de clorofilas um parâmetro de grande relevância para a avaliação da qualidade durante o pós-colheita, informando o grau de amadurecimento e o estado de conservação das hortaliças (AGUERO *et al.*, 2008; Borowski, 2015).

Além das características de firmeza e cor que afetam consideravelmente a qualidade pós-colheita de alface, a literatura relata que o armazenamento afeta o conteúdo de diversos compostos com atividade antioxidante (ARBOS, 2009). No presente estudo, observou-se redução no conteúdo de flavonoides totais no tratamento EH, após 3 dias de armazenamento, o qual foi restaurado após 7 dias de armazenamento. Apesar disso, o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total não foram afetados pelo armazenamento, sugerindo que as condições de armazenamento preservaram estes compostos. No entanto, ao realizar análise de compostos fenólicos individuais foi possível observar que vários deles foram de fato afetados pelo armazenamento, como ácido caféico, quercetina malonilglucósido, ácido 3,5-dicafeioquínico, ácido monocaffeoyl tartárico, ácido 5-p-coumaroilquínico e ácido 2- cafeoilquínico, os quais foram afetados negativamente no tratamento controle. Porém, as alfaces submetidas previamente aos estresses apresentaram um número menor de compostos fenólicos que tenham sido afetados pelo armazenamento, sendo que alguns dos compostos afetados no tratamento controle não foram afetados nos tratamentos com estresse, a exemplo do ácido caféico, cujo conteúdo se mostrou reduzido apenas no controle e no tratamento EH, após armazenamento. Estes resultados sugerem que a aplicação destes estresses teve um efeito 'priming' que atenuou a resposta das plantas ao estresse do armazenamento. Apesar disso, os valores de conteúdo de compostos fenólicos individuais foram mais afetados pelos tratamentos, conforme observado no Dia 0, do que pelo armazenamento (Figura 13).

## 7 Considerações finais

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram a aplicação de estresse hídrico em alface se caracteriza como uma estratégia promissora para melhorar a produção e qualidade de alfaces. Isto porque a aplicação de estresse hídrico em alface promoveu um aumento na biomassa das plantas nos tratamentos EH 90% e EH, e não afetou a coloração ou a firmeza das plantas. O tratamento EH 80% destacou-se quanto aos parâmetros de qualidade, pois resultou em plantas com maior conteúdo de carotenoides, clorofilas, ácido caféico, ácido monocaffeoyl tartárico, quercetina malonilglucósido, quercitina-3-O-glucuronida, e maior atividade antioxidante total, no momento da colheita. As plantas submetidas ao estresse hídrico não apresentaram mudanças na firmeza durante o armazenamento, porém apresentaram incremento no conteúdo de flavonoides, em EH, e um número menor de compostos fenólicos ou flavonoides que tenham sido afetados negativamente pelo armazenamento, sugerindo que houve um efeito 'priming'.

Em conjunto, estes resultados indicam que a aplicação de estresse hídrico, especialmente no nível de 80%, em alface representa uma estratégia interessante para melhorar a qualidade desta hortaliça no momento da colheita e após armazenamento. A literatura reforça os benefícios da utilização de um estresse hídrico.

## REFERÊNCIAS

ABCSEM. Associação Brasileira de Sementes e Mudas. 2015. Acesso em janeiro de 2020 < <https://www.abcsem.com.br/index.php>>.

ABDILLE, M.H.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, London, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.

Agüero, M. V., Ansorena, M. R., Roura, S. I., & del Valle, C. E. Thermal inactivation of peroxidase during blanching of butternut squash. **LWT - Food Science and Technology**, 41(3), 401–407. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.029. 2008.

AGUSTÍ, A. R et al. Analysis of Eleven Phenolic Compounds Including Novel p-Coumaroy Derivatives in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) by **Ultra-high-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection**. n. June 2010, p : 555-563,2011.

Akıncı, S; Dorothy M. Lösel. Plant Water-Stress Response Mechanisms. **Water Stress**. Prof. Ismail Md. Mofizur Rahman (Ed.), ISBN: 978-953-307-963-9, 2012.

AKRAM, Nudrat Aisha; SHAFIQ, Fahad & ASHRAF, Barakat. Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**, 8. 2017.

Almeida, H. J; Dutra, A. F; Filho, A. B. C. **Biofortificação de hortaliças e saúde global - Um enfoque para selênio, zinco, ferro e iodo**. 2016 <https://www.researchgate.net/publication/323881150> , acessado em 27 de setembro de 2019.

ALSCHER, Ruth et al. Demmig-Adams, B. (1993). Antioxidants in Higher Plants. Boca Raton: **CRC Press**, 1993.

ALTUNKAYA, A.; GÖKMEN, V. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content on fresh lettuce (*Lactuca sativa*). **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 3, p. 1173-1179, 2008.

ARBOS, K. A; FREITAS, R. J. S; STERTZ, S. C; DORNAS, M. F. Antioxidant activity and phenolic content in organic and conventional vegetables. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, 30(2): 501-506, abr.-jun. 2010.

BAENAS, Nieves et al. Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods phytochemistry Laboratory, Department of **Food Science and Technology**, CEBAS-CSIC.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie* 28:25-30.

BOROWSKI, Joyce et al. Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses. **Planta**. 2014.

CALDWELL, C.R. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 16, p. 4589-4595, 2003.

Cassetari, L. S. **Teor de Clorofilas e B-Caroteno em Cultivares e Linhagem de Alfaces**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia- Fitotecnia, 68 p. 2010.

CARDELLO, H.M.A.B.; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*mangífera índica l.*) var.haden, durante o amadurecimento. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v.18 n.2, p.211-217,1998. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010120611998000200013&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120611998000200013&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso Jan. 2020.

CHITARRA, A. B. **Armazenamento de frutos e hortaliças por refrigeração**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 20 p. Texto acadêmico manutenção e qualidade.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2005.

CONNOLLY, E. L. Raising the bar for biofortification: enhanced levels of bioavailable calcium in carrots. **Trends in Biotechnology**, v.26, n.8, 2008.

CORDENUNSI, B. R.; GENOVESE, M. I; NASCIMENTO, J. R. O.; HASSIMOTTO, N. M. A.; SANTOS, R. J.; LAJOLO, F. M. Effect of temperature

on the chemical composition and antioxidant activity on three strawberry cultivars. **Food Chemistry**, v. 91, p. 113 – 121, 2005.

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

Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem* 50:6910–6916.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: From plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v.11, p. 153-177, 2012.

CATUCHI, T.A.; VÍTOLO, H.F.; BERTOLLI, S.C.; SOUZA, G.M. Tolerance to water deficiency between two soybean cultivars: transgenic versus conventional. **Ciência Rural**, v.31, p.373-378, 2011.

CHON, Sang-Uk et al. **Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants**. *Scientia horticultrae*, v. 106, n. 3, p. 309-317, 2005.

COSTA, Cyro & SALA, Fernando. A evolução da alfacicultura brasileira. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 23, n. 1, p. 118-120, 2005.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013. Dietary (Poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**. 18, 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>.

DuPont, Susan et al. Effect of Variety, Processing, and Storage on the Flavonoid Glycoside Content and Composition of Lettuce and Endive. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(9), 3957–3964. 2000.

DURAZZO, Alessandra et al. Antioxidants in italian head lettuce (*Lactuca sativa* var. *Capitata* L.) grown in organic and conventional systems under greenhouse conditions. **Journal of Food Biochemistry**, v.38, p. 56-61, 2014.

EDI, I. I. Catálogo Winners e Commodities. 2019.

Escamilla, J. O.M; Parrilla, E. A; Rosa, L. A; Gastelum, J. A. N; Aguilar, G. A. ; García, J. R. Effect of Different Elicitors and Preharvest Day Application on the Content of Phytochemicals and Antioxidant Activity of Butterhead Lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata*) Produced under Hydroponic Conditions. **J. Agric. Food Chem.** 2017, 65, 5244–5254 .

ERICKSON, J. E. **Yield enhancement by short-term imposition of severe water deficit in the vegetative growth stage of grain sorghum.** n. April, p. 309–314, 2017.

FINGER, F.L; VIEIRA, G. **Controle da perda pós-colheita de água em produtos hortícolas.** Viçosa: UFV, 1997. 29 p.

FELTRIN. Feltrin Sementes. 2020. Acesso ao site, catálogo de hortaliças. Janeiro de 2020 < <https://www.sementesfeltrin.com.br/pt>>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (**FAOSTAT**), Crop Lettuce, production quantity, acessado em outubro de 2018.

GARCÍA-MACÍAS, P.; ORDIDGE, M.; VYSINI, E.; WAROONPHAN, S.; BATTEY, N.H.; GORDON, M.H.; HADLEY, P.; JOHN, P.; LOVEGROVE, J.A.; WAGSTAFFE, A. Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (*Lollo Rosso*) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 25, p. 10168-10172, 2007.

GARRIDO, Y.; GIL, M. I.; TOMA, F. A. Untargeted metabolomics approach using UPLC-ESI-QTOF-MS to explore the metabolome of fresh-cut iceberg lettuce. p. 1–13, 2016.

Galli, Vanessa; et al. Transcriptome analysis of strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits under osmotic stresses and identification of genes related to ascorbic acid pathway. **Physiologia Plantarum.** 2018.

GALLIE, Daniel. The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p. 695–709, 2013.

GOSSETT, Dalton et al. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. **Crop Sci** 34: 706–714. 1994.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Tipos de alface cultivadas no Brasil**. 1ª ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 7p.

HEIMLER, D.; ISOLANI, L.; VIGNOLINI, P.; TOMBELLI, S.; ROMANI, A. Polyphenol content and antioxidative activity in some species of fresh consumed salads. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 5, p. 1724-1729, 2007.

HERMS, Daniel & MATTSON, William. The dilemma of plants: to grow or defend. **Q. Rev. Biol.** 67, 283–335. 1992.

HAVAUX, Michel et al. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf development stage in the npq1 Arabidopsis mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. **Plant Physiol** 124: 273–284. 2000.

HAWRYLAK-NOWAK, Barbara. Comparative effects of selenite and selenate on growth and selenium accumulation in lettuce plants under hydroponic conditions. **Plant Growth Regulation**, v.70, p. 149–157, 2013.

HOFFMANN, J. F.; CRIZEL, R. L.; MADRUGA, N. A. de; BARBIERI, R. L.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. **Flavan-3-ol, flavanone, flavone, flavonol, phenolic acid, and stilbene contents of four Butia species (Arecaceae)**. *Frutas* v. 73, p. 125-137, mar/abr 2018.

Jacinto, A. C. P. **Resistência vertical e horizontal de progênies F5:6 de alface biofortificada a raças de *Bremia lactucae***. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Uberlândia. 2018.

JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S.; REDONDO-NEVADO, J.; MUÑOZ-BLANCO, J.; CABALLERO, J. L.; LÓPEZ-ARANDA, J. M.; VALPUESTA, V.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M. A; MERCADO, J. A. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. **Plant Physiology**, v. 128, p. 751 – 759, 2002.

Jiménez-Arias, D; Garcia-Machado, F.J; Morales-Sierra,S; Luis,J.C; Suarez, E; Hernandez, Valdes, M. F; Borges, A. A. Lettuce plants treated with L-pyroglutamic acid increase yield under water deficit stress. **Environmental and Experimental Botany**. 2018.

JOHN, T.; EYZAGUIRRE, P.B. Biofortification, biodiversity and diet: A search for complementary applications against poverty and malnutrition. **Food Policy**, 32, p.1-24, 2007.

KADER, A. A. Respiration and gas Exchange of vegetables. In: WEICHMANN, J. (Ed.). **Postharvest physiology of vegetables**. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 25-43.

LAWBE, et al. Measuring and modelling seasonal variation of carbon dioxide and water vapour exchange of a Pinus ponderosa forest subject to soil water deficit. *Global Change Biology*, 6: 613-630. 2000.

LEE, Jung; et al. Effects of dietary supplementation with redpigmented leafy lettuce (*Lactuca sativa*) on lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high-fat high-cholesterol diet. **British Journal of Nutrition**, v.101, p. 1246-1254, 2009.

LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 207–220, 2000.

LEIPNER, Jorg; FRACHEBOUD, Yvan & STAMP Peter. Effects of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. **Environ Exp Bot** 42: 129–139.1999.

LLORACH, Rafael et al. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chem**. 108, 1028–1038.2008.

LOCATTO, Vittoria; CIMINI, Sara & GARA, Laura De; Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification. **Frontiers in Plant Science**, 2013.

LOCATTO, V.; CIMINI, S.; GARA, L.; Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification. **Frontiers in Plant Science**, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00152.

LOCATTO, V.; CIMINI, S.; GARA, L.; Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification. **Frontiers in Plant Science**, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00152.

MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L.; CHITARRA, A. B.; PRADO, M. E. T. Qualidade de alface crespa minimamente processada armazenada sob refrigeração em dois sistemas de embalagem. **Horticultura Brasileira**. vol.25 n°.4 Brasília Oct./Dec. 2007. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362007000400003>>. Acesso Jan. 2020.

M. Sorrentino, G. Colla, Y. Rouphael, K. Panzarová, M. Trtílek. Lettuce reaction to drought stress: automated high-throughput phenotyping of plant growth and photosynthetic performance. **Acta Hort.** 1268. ISHS 2020. DOI 10.17660/ActaHortic.2020.1268.17 Proc. XI Int. Symp. on Protected Cultivation in Mild Winter Climates and I Int. Symp. On Nettings and Screens in Horticulture Eds.: J.A. Fernández et al.

Magnani F, et al. We will explore the available knowledge about the fluorescence of vegetation. **Proc Natl Acad Sci USA** 111: E2510. 2014.

Magnani, M., Rezek, Z., Lin, SC, Chan, A. e Dibble, HL. Flake variation in relation to the application of force. **Journal of Archaeological Science**, 46, 37-49. doi: 10.1016 / j.jas.2014.02.029 . 2014.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MUNNÉ-BOSCH; SCHWARZ & ALEGRE. Water deficit in combination with high solar radiation leads to midday depression of -tocopherol in field-grown lavender (*Lavandula stoechas*) plants. Aust. **J. Plant Physiology**. 28, 315–321. 2001.

CALBO, A. G. Alface (*Lactuca sativa*). In: LUENGO, R. F. A.; CALBO, A. G. (Ed.). **Armazenamento de hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2001. p. 117-121.

MUÑOZ & MUNNÉ-BOSCH. Photo-Oxidative Stress during Leaf, Flower and Fruit Development. **Plant Physiology**, 176(2), 1004–1014. 2017.

My Food Data: <https://tools.myfooddata.com/nutrition-facts.php?food=11253&serv=wt1> acessado em outubro, 2018.

MONAGHAN, J. M. et al. **Deficit irrigation reduces postharvest rib pinking in wholehead Iceberg lettuce , but at the expense of head fresh weight.** n. July, 2016.

MESSIAS, R. S; GALLI, V.; SILVA, S. D. A.; SCHIRMER, M. A.; ROMBALDI, C. V. Micronutrient and functional compounds biofortification of maize grains. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2013.

MUNNE-BOSCH & ALEGRE .Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. **Planta** **210**: 925–931.2000.

MUNNÉ-BOSCH.  $\alpha$ -Tocopherol: A Multifaceted Molecule in Plants. **Vitamins & Hormones**, 375–392.

MARTÍNEZ-BALLESTA, Carmen et al. Agricultural practices for enhanced human health. **Phytochemistry Reviews**, 7(2), 251–260.2008.

MCKERSIE & LESHEM. Chilling stress. In: McKersie, B.D., Leshem, Y.Y. (Eds.), *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht/Boston/London, pp. 79–103. 1994.

MENÈ-SAFFRANE & SÈBASTIEN-PELLUD Current strategies for vitamin E biofortification of crops .*Current Opinion in Biotechnology* 44(): 189–197, 2017.

MÈNE-SAFFRANÉ, L., & PELLAUD, S. (2017). Current strategies for vitamin E biofortification of crops. **Current Opinion in Biotechnology**, 44, 189–197.

MENTE, Andrew et al. A Systematic Review of the Evidence Supporting a Causal Link Between Dietary Factors and Coronary Heart Disease. **Archives of Internal Medicine**, 169(7), 659. 2009.

MESSIAS, Rafael et al. ISOLATION OF HIGH-QUALITY RNA FROM GRAINS OF DIFFERENT MAIZE VARIETIES. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 44(7), 697–707. 2014.

MITJAVILA % MORENO. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. **Biochemical Pharmacology**, v.84, p. 1113–1122, 2012.

MORENO-ESCAMILLA, José Effect of Different Elicitors and Preharvest Day Application on the Content of Phytochemicals and Antioxidant Activity of Butterhead Lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata*). **Agricultural and Food Chemistry**, 2017.

MONAGHAN, J. M. et al. **Deficit irrigation reduces postharvest rib pinking in wholehead Iceberg lettuce , but at the expense of head fresh weight**. n. July, 2016.

Moraes, F. A Alessandra Miranda Cota, A. M; Milagres, F. C; Campos; Pinheiro-Sant'Ana, A. P. Vitamin C loss in vegetables during storage, preparation and distribution in restaurants. **Ciênc. saúde coletiva** vol.15 no.1 Rio de Janeiro Jan. 2010.

NASCIMENTO, G. A. S. et al. **Tratamento hidrotérmico na conservação e qualidade pós-colheita de alface**. REVISTA TRÓPICA: Ciências Agrárias e Biológicas. p.65-76, v.09, n.01, 2017.

PEH, Hong; et al. Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. **Pharmacology & Therapeutics**, 162, 152–169. 2016.

Park, C. M., Y. C. Hung, M. P. Doyle, and C. Kim. 2001. Pathogen reduction and quality of lettuce treated with electrolyzed oxidizing and acidified chlorinated water. **J Food Sci** 66:1368–72. doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15216.x.

PERCIVAL, David & Mackenzie, Joanna. Use of plant growth regulators to increase polyphenolic compounds in the wild blueberry. **Can J Plant Sci** 87: 336-336 .2007.

PÉREZ-LOPEZ, Usue; et al. Concentration of phenolic compounds is increased in lettuce grown under high light intensity and elevated CO<sub>2</sub>. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2018.

PERIN, E. C. **Nutrição e aporte hídrico: alterações bioquímico-fisiológicas e moleculares em morangos cv. Camarosa**. Dissertação Programa de Pós-graduação de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas .2014.

ROLEIRA, Fernanda et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, 183, 235–258. 2015.

Ribas-Agusti A, Gratacos-Cubarsi M, Sarraga C, Garcia-Regueiro JA, CASTELLARI M (2011) Analysis of eleven phenolic compounds including novel p-Coumaroyl derivatives in lettuce (*Lactuca sativa L.*) by ultra-high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry. **Phytochem Anal** 22:555-563.

Savvides, A., van Ieperen, W., Dieleman, J. A., & Marcelis, L. F. M. Phenotypic plasticity to altered apical bud temperature in *Cucumis sativus*: more leaves–smaller leaves and vice versa. **Plant, Cell & Environment**, 40(1), 69–79. doi:10.1111/pce.12835. 2016.

Song W, Derito CM, Liu MK, He X, Dong M, Liu RH. Cellular antioxidant activity of common vegetables. *J Agric Food Chem* 58:6621-6629, 2010.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1974) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152-178.

STRINGHETA, P. C; NACHTIGALL, A. M; OLIVEIRA, T. T; RAMOS, A. M; SANT'ANA, H. M. P; Conceição GONÇALVES, M. P. J. C. Luteína: Propriedades Antioxidantes e Benefícios à saúde. **Alim. Nutr.**, Araraquara v.17, n.2, p.229-238, abr./jun. 2006.

Santos, J. C. M; Perfeito, D. G. A; Silva, A. R; Borges, L, C. R. **Influência da embalagem e temperatura de armazenamento na vida útil de alface crespa (*Lactuca sativa L.*)** R. bras. Tecnol. Agroindustr., Ponta Grossa, v. 18, n.01: p. 2542-2555, jan./jun. 2018.

SALA, Fernando & COSTA, Cyro. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v.30, p. 187-194, 2012.

SANTOS, Francielly et al. Comparison of five agro-industrial waste-based composts as growing media for lettuce: Effect on yield, phenolic compounds and vitamin C. *Food Chemistry*, 209, 293–301. 2016.

SHAFID, Muhammed; SINGH, Zora and KHAN, Ahmad, Pre-harvest spray application of methyl jasmonate improves red blush and flavonoid content in Cripps Pink apple. **J Hortic Sci Biotechnol** 86: 422–430 .2011.

SMIRNOFF, Nicholas & WHEELER, Glen. (2000). Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 291–314.

SMIRNOFF, Nicholas. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. **Free Radical Biology and Medicine**,2018.

SONG, Wei et al. Cellular antioxidant activity of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v.58, p. 6621–6629, 2010.

Streb P. et al. Divergent strategies of photoprotection in high-mountain plants. *Planta* 207: 313–324.1998.

Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. Quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 10, 63e68.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 6. ed., Artmed, 2017. 918 p.

TAVARINI, Silvia et al. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. **Food chemistry**, v. 107, n. 1, p. 282-288, 2008.

THAKUR, M. et al. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic**.

TIAN, Ye et al. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. **Food chemistry**, v. 220, p. 266-281, 2017.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 616-622, 2007.

VIACAVA, Gabriela E. et al. Natural elicitors as preharvest treatments to improve postharvest quality of Butterhead lettuce. **Scientia Horticulturae**, v. 228, p. 145-152, 2018.

VILELA, N. J.; LANA, M. M.; NASCIMENTO, E. N. et al . O peso da perda de alimentos para a sociedade: o caso das hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, 2003. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-05362003000200002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362003000200002)>.

Vuolo, M. M; Lima, V. S; Marostica, M. R. J. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. **Bioactive Compounds**. Páginas 33-50. 2019.

VISSERS, M. C.; BOZONET, S. M.; PEARSON, J. F.; BRAITHWAITE, L. J. Dietary ascorbate intake affects steady state tissue concentrations in vitamin C deficient mice: tissue deficiency after suboptimal intake and superior bioavailability from a food source(kiwifruit). **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.93, p. 292–301, 2011.

WANG, Shiw Y.; ZHENG, Wei. Preharvest application of methyl jasmonate increases fruit quality and antioxidant capacity in raspberries. **International journal of food science & technology**, v. 40, n. 2, p. 187-195, 2005.

WANG, Shiw Y.; GAO, Haiyan. Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **LWT-Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 71-79, 2013.

WHEELER, G. L.; JONES, M. A.; SMIRNOFF, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature**, v.393, p. 365–369, 1998.

WANG, Shao-wei et al. Alpha-tocopherol quinine ameliorates spatial memory deficits by reducing beta-amyloid oligomers, neuroinflammation and oxidative stress in transgenic mice with Alzheimer's disease. **Behavioural brain research**, v. 296, p. 109-117, 2016.

WANG, Shioh Y.; BOWMAN, Linda; DING, Min. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p.1261-1269,2008.

Wiegant, F. A., de Poot, S. A., Boers-Trilles, V. E. & Schreij, A. M. **Hormesis and cellular quality control: a possible explanation for the molecular mechanisms that underlie the benefits of mild stress**. *Dose Response* 11, 413–430 (2012).

WHEELER, Glen L.; JONES, Mark A.; SMIRNOFF, Nicholas. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature**, v. 393, n. 6683, p. 365, 1998.

WILLS, R.; McGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. **Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamental**. 4th edition. Wallingford: CAB International, 1998. 262 p.

ZDRAVKOVIĆ, J. M.; AĆAMOVIĆ-ĐOKOVIĆ, G. S.; MLADENOVIĆ, J. D.; PAVLOVIĆ, R. M.; ZDRAVKOVIĆ, M. S. Antioxidant capacity and contents of phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in lettuce. **Hemijska industrija**, v.68, p. 193-198, 2014.

Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chem.** 1999, 64, 555–559.

ZHU, Changfu et al. Biofortification of plants with altered antioxidant content and composition: genetic engineering strategies. **Plant biotechnology journal**, v. 11, n. 2, p. 129-141, 2013.

Zlotec U, Swieca MS, Jakubczyk A (2014) Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Food Chem* 148:253-260.

ZŁOTEK, Urszula; ŚWIECA, Michał; JAKUBCZYK, Anna. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Food chemistry**, v. 148, p. 253-260, 2014.

## ANEXO

Anexo A- Imagem das alfaces na casa de vegetação



Anexo B- Imagens das alfaces, controle, EH 80%, EH 90% e EH.



Anexo C – Imagem do controle diário do volume de água a ser aplicado em cada vaso durante o experimento.

