

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Jucemary Simplício de Araujo

“Desenvolvimento vegetal, produção e composição química do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) em função do fornecimento de N, P, K e B e da aplicação de ácido Jasmônico.”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Ar15e	Araújo, Jucemary Simplício Desenvolvimento vegetal, produção e composição Química do óleo essencial de <i>Cordia verbenacea</i> DC. (Boraginaceae) em função do fornecimento de N, P, K e B e da aplicação de ácido Jasmônico / Jucemary Simplício Araújo. –Campinas, SP: [s.n.], 2007. Orientadora: Vera Lúcia Garcia Rehder. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Plantas medicinais. 2. <i>Cordia verbenacea</i>. 3. Metabolismo secundário. 4. Óleo essencial. 5. Minerais na nutrição de plantas. I. Rehder, Vera Lúcia Garcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (rcdt/ib)
-------	---

Título em inglês: Vegetal development, production and chemical composition of essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae), in relation to N, P, K and B supply and Jasmonic acid application.

Palavras-chave em inglês: Medicinal plants; *Cordia verbenacea* DC; Secondary metabolism; Essential oil; Plants mineral nutrition.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

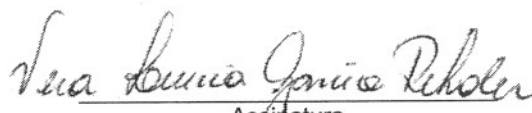
Banca examinadora: Vera Lúcia Garcia Rehder, Cláudia Regina Batista Haddad, Luis Vitor Silva do Sacramento.

Data da defesa: 23/02/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

BANCA EXAMINADORA

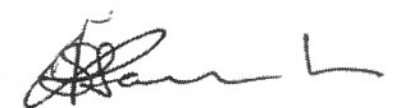
Profa. Dra. Vera Lúcia Garia Rehder
(Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Cláudia Regina Batista Haddad


Assinatura

Prof. Dr. Luis Victor Silva do Sacramento


Assinatura

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

Assinatura

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Assinatura

200749016

INDICE

	Página
Agradecimento	Vi
Lista de abreviaturas	vii
Lista de Tabelas	Viii
Lista de Figuras	ix
Resumo	x
Abstract	xii
1. Introdução geral	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Planta estudada	4
2.2. Metabólitos secundários e óleos essenciais	8
3. Referências bibliográficas	12
Capítulo 1	17
Efeito da nutrição mineral no desenvolvimento da planta, produção e composição química do óleo essencial de <i>Cordia verbenacea</i> .	
1. Introdução	18
2. Objetivos específicos	21
3. Material e Métodos	22
3.1. Material vegetal	22
3.2. Experimentos	23
3.2.1. Omissão de N, P, F e B e suplemento de N.	23
3.2.2. Suplemento de nitrogênio e fósforo	24
3.3. Coleta	24
3.4. Soluções nutritivas utilizadas nos tratamentos	25
3.5. Extração de óleo essencial	27
3.6. Análise cromatográfica do óleo essencial e determinação do Índice de Kovats dos compostos majoritários	28
3.7. Análise de crescimento	29
3.7.1. Comprimento da parte aérea.	30
3.7.2. Massa da matéria seca	30

3.7.3. Taxa de assimilação líquida (TAL)	30
3.7.4. Taxa de crescimento relativo (TCR)	31
3.7.5. Razão raiz parte aérea (R/PA)	31
3.7.6. Razão de área foliar (RAF)	31
3.7.7. Área foliar específica (AFE)	32
3.8. Avaliação de sintomas de desnutrição	32
3.9. Análise estatística dos dados	32
4. Resultados	33
4.1. Sintomas de desnutrição observados	33
4.2. Diagnose de macro e micronutrientes	36
4.3. Rendimento e composição química do OE	37
4.4. Respostas às características avaliadas	40
5. Discussão	44
6. Conclusões	51
7. Referências bibliográficas	52
Capítulo 2:	56
Ação do ácido jasmônico sobre o rendimento, a composição química do óleo essencial e o teor de α -humuleno.	
1. Introdução	57
2. Objetivos Específicos	59
3. Material e Métodos	60
3.1. Material vegetal	60
3.2. Experimento	60
3.2.1 Aplicação de AJ em folhas de <i>C. verbenacea</i>	60
3.2.2 Coleta	61
3.3. Extração de óleo essencial	61
3.4. Análise cromatográfica do óleo essencial e determinação do Índice de Kovats dos compostos majoritários	62
3.5. Análise estatística dos dados	63
4. Resultados e Discussão	64
5. Conclusões	70
6. Referências bibliográficas	71

AGRADECIMENTOS

- À UNICAMP por me fornecer uma ampla formação em diversas áreas da vida.
- Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, pela oportunidade.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa durante o curso.
- À Vera, minha orientadora, pela oportunidade de aprendizado, confiança e amizade.
- À Dra. Glyn Mara e à Divisão de Agrotecnologia (CPQBA-UNICAMP), pela cessão de plantas utilizadas no experimento.
- À Profa. Dra. Cláudia Regina Batista Haddad pelas valiosas sugestões e auxílio.
- À Profa Dra. Marlene Schiavinato, Paiola, Dulce e demais professores e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal (IB-UNICAMP) pelo esclarecimento de dúvidas e disposição em ajudar.
- À Adriana, Adilson, Ana, Aline, Lucília, Marili, Sinésio e toda a equipe da Divisão de Química orgânica e Farmacêutica, pela fundamental contribuição para a realização deste trabalho.
- Aos amigos Ana, Anderson, Daniela, Erika, Gabriela, George Gustavo, Marcela , Rosa e Vanessa pelas madrugadas de trabalho na UNICAMP, pelo auxílio fotográfico e por todo apoio.
- Ao Fabiano, Gilberto, Jane, Javier, Leo e todos os amigos do curso de biologia vegetal, pela disposição em ajudar, pela troca de experiência, oportunidade de convivência e amizade.
- Às novas amigas Gabi e Juliane, pela ajuda na conclusão do trabalho.
- A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho e compartilharam esses anos inesquecíveis de minha vida.

LISTA DE ABERVIATURAS

AFE – Área Foliar Específica

AJ – Ácido Jasmônico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

-B – tratamento realizado com omissão no fornecimento de Boro

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas .

DBF – Dibutylfitalato

DOX-P – 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfate

IAC – Instituto Agronômico de Campinas.

IAF – Índice de área foliar

IL-1 β – Interleucina 1 Beta.

IK – Índice de Kovats

IPP – isopentenil difosfato

DMAPP – dimetilalil difosfato

-K – tratamento realizado com omissão no fornecimento de potássio

MeJA – Metil Jasmonato

MS – Massa Seca

-N – Tratamento realizado com omissão no fornecimento de nitrogênio.

OE – Óleo essencial

OMS – Organização Mundial de Saúde

-P – Tratamento realizado com omissão no fornecimento de Fósforo

PA – Para Análise

RAF – Razão de área foliar

TAL – Taxa de Assimilação Líquida

TCR – taxa de Crescimento Relativo

TNF- α – Fator de necrose tumoral alpha

TPS – Terpeno Sintase

t_R min – Tempo de retenção

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição química das soluções nutritivas utilizadas no experimento com omissão no fornecimento de N, P, K, e suplemento de N na concentração de 238mg/L. (SARRUGE, 1975).	26
Tabela 2. Composição química das soluções nutritivas utilizadas nos experimentos com suplemento de N e P.	26
Tabela 3. Teores de macronutrientes em folhas de <i>C. verbenacea</i> em função da nutrição mineral.	37
Tabela 4. Teores de micronutrientes em folhas de <i>C. verbenacea</i> em função da nutrição mineral.	37
Tabela 5. Rendimento de óleo essencial (OE) e porcentagem de α -humuleno em <i>C. verbenacea</i> em função da nutrição mineral.	38
Tabela 6. Rendimento de óleo essencial (OE) e porcentagem de α -humuleno em <i>C. verbenacea</i> em função das concentrações de P presentes nas soluções nutritivas utilizadas.	38
Tabela 7. Rendimento de óleos essenciais (OE) e porcentagem de α -humuleno em <i>C. verbenacea</i> em função das concentrações de N presentes nas soluções nutritivas utilizadas.	39
Tabela 8. Tempo de retenção (tR), Índice de Kovats (IK) e percentuais relativos dos compostos mais abundantes presentes no OE de <i>C.verbenacea</i> (Experimento 1).	39
Tabela 9. Tempo de retenção (tR), Índice de Kovats (IK) e percentuais relativos dos compostos mais abundantes presentes no OE de <i>C.verbenacea</i> (Experimento 2).	40
Tabela 10. Comparação entre médias de Massa da matéria Seca (MS) (raiz, caule, folhas e total), R/PA, TCR e altura em função da nutrição mineral de <i>C. verbenacea</i> .	41
Tabela 11. Comparação entre médias de Massa Seca (MS) (raiz, caule, folhas e total), R/PA, AFE, RAF, RMF, TAL, TCR e altura em função do suplemento de N.	42
Tabela 12. Comparação entre médias de Massa Seca (MS) (raiz, caule, folhas e total), R/PA, AFE, RAF, RMF, TAL, TCR e altura em função do suplemento de P.	42
Tabela 13. Rendimento de óleos essenciais (OE) e porcentagem de α -humuleno em <i>C. verbenaea</i> em função do tempo após o tratamento com AJ.	64
Tabela 14. Tempo de retenção (tR), Índice de Kovats (IK) e percentuais relativos médios (3 repetições) dos compostos mais abundantes presentes no OE de <i>C verbenacea</i> . Tratamento com AJ e controles.	68

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aspecto geral do ramo de <i>C. verbenácea</i> mostrando folhas expandidas e em crescimento. Notar a tendência da espécie a filotaxia alterna. Fonte: Shimizu 2006.	5
Figura 2. Flor pentâmera e frutos de <i>C. verbenácea</i> . Fonte: Shimizu 2006.	5
Figura 3. Estrutura química do α -humuleno.	7
Figura 4. Esquema da biossíntese de terpenos (LICHTENTHALER, 1999).	10
Figura 5. Muda de <i>C. verbenacea</i> utilizada no experimento. Fonte: Shimizu 2006.	22
Figura 6. Folhas de <i>C. verbenacea</i> com sintomas de deficiências minerais. (A) aspecto de folha do tratamento controle; (B) limbo escurecido observado em plantas dos tratamentos com omissão no fornecimento de P, B e K; (C) coloração de folhas predominante no tratamento com omissão no fornecimento de N; (D) e (E) deformações observadas na lâmina foliar do tratamento com omissão no fornecimento de B. Fonte: Shimizu 2006.	35
Figura 7. Folhas de <i>C. verbenacea</i> em função do excesso de minerais. (A) Necrose marginal em folhas submetidas a suplemento de P. (B) Pontuações cloróticas visualizadas em folhas submetidas a suplemento de P ou N (266 mg/L). Fonte: Nascimento 2006.	36
Figura 8. Rendimento de OE em <i>C. verbenacea</i> : Controle e tratamento após 2, 24 e 48h. Observar o aumento no rendimento de OE verificado no tratamento controle depois de 24h.	65
Figura 9. Cromatograma do OE das folhas de <i>C. verbenacea</i> do tratamento com AJ (coleta após 2 horas).	66
Figura 10. Cromatograma do OE das folhas de <i>C. verbenacea</i> do tratamento controle (coleta após 2 horas).	66

RESUMO

Cordia verbenacea, (Boraginaceae), planta medicinal nativa do Brasil, apresenta em seu óleo essencial compostos com atividade antiinflamatória. Devido às suas propriedades terapêuticas, existe um grande interesse na ampliação de estudos sobre a planta. O presente estudo investigou o efeito da nutrição mineral e do ácido jasmônico (AJ) no desenvolvimento da planta, na produção, composição química e teores de α -humuleno do OE. As plantas foram submetidas a tratamentos nutricionais com solução de Hoagland completa, omissão de N, K, P, B e suplemento de P e N. Durante o experimento foram observadas características de sintomas de deficiência nutricional. Após 90 dias de tratamento algumas características foram avaliadas como a altura das plantas e a área foliar, as plantas foram coletadas, o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e submetido à cromatografia a gás e espectrometria de massa. A deficiência em N foi mais limitante ao crescimento da planta. Sob esta deficiência a planta apresentou uma maior relação raiz/parte aérea, o que sugere uma maior alocação de recursos para a raiz numa situação de carência de N. A produção de folhas foi equivalente para a maioria dos tratamentos, com redução significativa no tratamento **-P**, suplemento de P (60 mg/L) e uma redução mais severa em **-N**. A omissão de B e K causou uma diminuição da absorção de P, provocando também um comprometimento nas estruturas de sustentação da planta. As plantas submetidas à omissão de P possivelmente apresentaram modulação dos sistemas de absorção deste nutriente, pois em um meio com maior escassez de P apresentaram maiores concentrações foliares

deste elemento que nos tratamentos **-B** e **-K**. O suplemento de P (60 mg/g), foi o único tratamento nutricional em que se verificou um aumento na produção de OE. Nos tratamentos com omissão no fornecimento de nutrientes esta produção foi menor. O percentual de α -humuleno foi equivalente entre a maioria dos tratamentos, contudo, o suplemento de P (60 mg/g), apesar do aumento do rendimento de OE, ocasionou uma queda no teor de α -humuleno. Duas horas após a aplicação de AJ foi verificado um aumento na produção de OE com a detecção de uma série de compostos ausentes no grupo controle, no entanto, os teores de α -humuleno não se alteraram. A escassez de estudos nutricionais sobre *C. verbenacea* não permite o estabelecimento de um estado nutricional adequado para a espécie, contudo, a planta aparentemente apresenta eficiência na absorção e utilização de nutrientes, pois mesmo em uma situação de omissão de nutrientes seu crescimento, produção de matéria seca, e taxa de crescimento relativo foram, em geral, pouco comprometidos.

ABSTRACT

The essential oil of *Cordia verbenacea*, a native Brazilian medicinal plant, presents anti-inflammatory properties. Due to its therapeutic properties, there is great interest in expanding research on it. The present study investigates the effect of mineral nutrition and jasmonic acid application on this plant's development, yield, chemical composition, and essential oil α -humulene concentration. The plants were submitted to nutritional treatments with Hoagland complete solution, N, K, P and B omission and P and N supplement. Nutritional deficiency symptoms were observed in the course of the experiment. After 90 days of treatment, some characteristics were evaluated, such as the plants' height and foliar area, plants were collected, and essential oil was extracted via hydrodistillation and submitted to gas chromatography and mass spectrometry. N deficiency was the most limiting factor in the plant growth. This deficiency presented a higher relation rate (root/shoot), suggesting that the lack of N affected shoot development. Lack of N showed a higher allocation of resources to the root rather than to the shoot. Leaf production was equivalent for most treatments, with significant reduction in -P treatment, P supplement (60 mg/L) and a more severe reduction in -N. B and K omission possibly caused a reduction in P absorption, also provoking alteration in the plant's sustaining structures. The plants submitted to P omission probably presented modulation in the nutrient absorption systems because in an environment with higher P scarcity, the nutrient presented higher foliar concentration levels of this element than in -B and -K treatments. The P supplement (60 mg/g) was the only

nutritional treatment in which an essential oil yield increase was observed. The yield was lower in treatments with omission of nutrients. The percentage of α -humulene was equivalent among most treatments, yet the P supplement (60 mg/g), despite the increase in the essential oil yield, caused a decrease in the α -humulene content. Two hours after the AJ application, an increase in the production of essential oil was observed, with the detection of several compounds absent in the control group. Yet, the α -humulene percentage was not altered. The shortage of nutritional studies on *C. verbenacea* does not allow for the establishment of an adequate nutritional outline for this species. Nevertheless, the plant seems to present efficiency in the absorption and use of nutrients, for even in a situation of nutrients omission, its growth, dry mass production, and relative growth rate were not, in general, significantly compromised.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura ou prevenção de doenças, é uma das mais antigas práticas medicinais de populações humanas de diferentes culturas (VEIGA JR *et al.*, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial depende da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde, e que cerca de 85% da medicina tradicional envolva o uso de plantas medicinais (NEVES, 2001; ALMEIDA, 1998).

Nos últimos anos, a utilização de plantas medicinais ou de produtos preparados a partir de seus constituintes tem aumentado nos países industrializados. Cerca de 40% dos produtos farmacêuticos utilizados nos países ocidentais são total ou parcialmente derivados de fontes naturais (ROUT & SAMANTARAY, 2000).

Dentre os fatores que levaram a um aumento desta demanda pode-se citar a preferência dos consumidores por terapias com produtos naturais, os efeitos colaterais de drogas sintéticas e seus altos preços e até a perigosa crença na inexistência de efeitos colaterais por parte de plantas medicinais. (CAPASSO, 2000; CALIXTO, 2000).

Acompanhando esta tendência, a indústria farmacêutica também apresenta um crescente interesse pelo potencial terapêutico de plantas, o que se verifica pelo aumento de investimento em pesquisas na área e desenvolvimento de novos produtos a partir de fontes naturais (NEVES, 2001; CALIXTO, 2000; SHU, 1998).

O mercado mundial de fitoterápicos envolve cerca de US\$ 40 bilhões anuais (ALVES, 2005). Segundo estimativa feita pela *PhytoPharm Consulting* em Berlim, até o ano de 2007 a fitoterapia deve movimentar mais de US\$ 47 bilhões anualmente (ALMEIDA,1998; NEVES, 2001).

À medida que aumenta a demanda por plantas medicinais, aumenta o risco de extinção ou de diminuição de sua variabilidade genética. (HOAREAU & Da SILVA, 1999). No Brasil, o mercado de fitoterápicos tem sido atendido, na maioria das vezes, por matéria-prima sem padronização, de qualidade duvidosa e proveniente de extrativismo predatório (NEVES, 2001).

Para o suprimento do mercado de plantas medicinais é necessária uma especial atenção para determinados pontos, tais como a ênfase na aclimação das espécies, o melhoramento genético e a ampliação de estudos e tecnologia para a produção vegetal (CALIXTO, 2000).

O cultivo comercial pode oferecer grandes vantagens como a presença de uniformidade e alta qualidade, características essas fundamentais para o desenvolvimento de medicamentos eficientes (CALIXTO, 2000). No Brasil, a maioria das plantas medicinais não é ainda cultivada, sobretudo as nativas, e grande parte das espécies cultivadas encontra-se ainda no estágio inicial de domesticação e as condições de cultivo não estão suficientemente estudadas (CHAVES, 2002).

Um outro problema adicional vem do fato do percentual da produção de metabólitos secundários ser geralmente baixo e os teores dos compostos com atividade de interesse serem ainda menores

(BALANDRIN *et al.*, 1985).

Investigações agronômicas e químicas referentes a plantas medicinais buscam não apenas maximizar o conteúdo de metabólitos secundários, mas também avaliar a variação de constituintes de interesse farmacêutico.

Cordia verbenacea DC. (Boraginaceae), espécie nativa do Brasil, apresenta em seu óleo essencial (OE) um princípio ativo com propriedades antiinflamatórias. Devido a suas propriedades terapêuticas, existe um grande interesse no desenvolvimento de um sistema de cultivo em larga escala para *C. verbenacea* (MAGALHÃES *et al.*, 2004) e na adoção de procedimentos e estudos de fatores que possam aumentar os teores de óleo essencial e do princípio ativo α -humuleno.

Neste contexto, os principais objetivos deste trabalho são:

- ✓ Investigar o efeito da nutrição mineral e estresse nutricional causado pela omissão de nutrientes no desenvolvimento da planta, na produção, composição química e teores de α -humuleno do OE.
- ✓ Avaliar o efeito do ácido jasmônico sobre a produção, a composição química do OE e o teor de α -humuleno.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Planta estudada.

O gênero *Cordia* L. possui cerca de 80 espécies, das quais, um relevante número tem sido empregado na medicina popular (BARROSO *et al.*, 2002).

Cordia verbenacea (Figuras 1 e 2) é uma planta perene, arbustiva, muito ramificada, com folhas simples, alternas, lanceoladas, com base acuminada e ápice agudo, margens dentadas, aromáticas (LORENZI & MATOS, 2002; FRESENIUS, 1857). Este espécime, cujo sinônimo nomenclatural é *Cordia curassavica*¹, é nativo de quase todo o Brasil, ocorrendo principalmente em áreas abertas da costa brasileira (AKISUE *et al.*, 1983; LORENZI & MATOS, 2002). Popularmente, a planta é conhecida por uma variedade de nomes, dentre eles, erva baleeira é o mais conhecido. *C. verbenacea* é tradicionalmente utilizada na medicina popular na forma de extratos alcoólicos, decoctos e infusões devido a suas propriedades antiinflamatórias, antireumáticas, antimicrobianas, analgésicas e tônicas (LORENZI & MATOS, 2002; PASSOS *et al.*, no prelo; HERNANDEZ *et al.*, no prelo).

¹ A comunidade científica têm usado os nomes *Cordia curassavica* e *Cordia verbenacea* de forma alternada para a produção de conhecimento para a espécie. Para este trabalho consideramos os dois nomes sinônimos de uma mesma espécie.



Figura 1. Aspecto geral do ramo de *C. verbenacea* mostrando folhas expandidas e em crescimento. Notar a tendência da espécie a filotaxia alterna.
 Fonte: Shimizu 2006.



Figura 2. Flor pentâmera e frutos de *C. verbenacea*. Fonte: Shimizu 2006.

Triagens fitoquímicas da espécie revelam a presença de compostos de variados grupos, incluindo fenóis (TICLI *et al.*, 2005), flavonóides (SERTIÉ *et al.*, 1990), mucilagem, óleo essencial e compostos terpênicos (AKISUE *et al.*, 1983; DE CARVALHO JR *et al.*, 2004; JORGE *et al.*, 1998; PASSOS *et al.*, 2006. no prelo; VELDE *et al.*, 1982).

As propriedades terapêuticas da planta têm despertado o interesse da comunidade científica e seus compostos são alvo de diversos estudos.

O OE, extraído da parte aérea da planta, apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas, como algumas cepas de *Staphylococcus aureus*, e fungos, contudo, a maioria das bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, mostraram-se resistentes, e apenas três linhagens de *Proteus mirabilis* e uma de *Proteus vulgaris* foram inibidas. O princípio ativo responsável pela atividade antimicrobiana ainda não foi determinado (DE CARVALHO JR *et al.*, 2004). Em outro estudo, o OE e extratos hexânicos e etanólicos da parte aérea da planta demonstraram atividade contra amostras de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e 5 linhagens de fungos. *Sarcina lútea*, *Vibrio cholerae* e *Rhizoctonia solani* foram as linhagens mais sensíveis ao OE (HERNANDEZ *et al.*, 2006. no prelo).

O ácido rosmarínico, um polifenol de *C. verbenacea*, inibiu o edema causado pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e a miotoxicidade causada por bothropstoxinas (BthTX-I e BthTX-II), miotoxinas mais abundantes no veneno. O ácido rosmarínico inibiu significativamente a miotoxicidade e a formação de edema provocados pelas miotoxinas em todas as concentrações estudadas, contudo, foi

menos efetivo contra a ação do veneno completo. Este foi o primeiro registro do ácido rosmarínico na espécie *C. verbenacea* e de sua ação antiinflamatória e propriedades antimiotoxina contra veneno de cobra e toxinas isoladas a partir dele (TICLI *et al.*, 2003; TICLI *et al.*, 2005).

A ação antiedematogênica do extrato diclorometânico bruto de folhas de *C. verbenacea* foi avaliada e nas doses de 300 mg/Kg e 1000 mg/Kg mostrou atividade, reduzindo o edema em pata de ratos em cerca de 45% e 69%, respectivamente depois de 5 horas da administração do indutor (BAYEUX *et al.*, 2002). Em resposta à injeção de carragenina em patas de camundongos, o OE da planta decresce significativamente a produção de TNF- α , sem afetar a produção da IL-1 β . (PASSOS, no prelo). Os princípios ativos identificados na planta são os sesquiterpenos α -humuleno (Figura 3) (PASSOS *et al.*, no prelo; MONTANARI JUNIOR & MAGALHÃES, 2004) e possivelmente o trans-cariofileno (PASSOS *et al.*, no prelo).

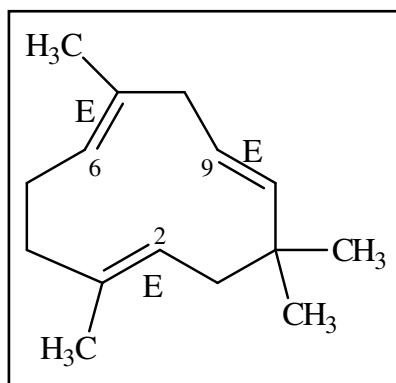


Figura 3. Estrutura química do α -humuleno.

O α -humuleno é o composto escolhido como marcador e sua presença dentro de determinadas concentrações é monitorada pela indústria farmacêutica para atestar a qualidade do OE utilizado.

Em 2004, foi concedida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) à empresa farmacêutica Aché Laboratórios Farmacêuticos, a aprovação do registro do primeiro antiinflamatório tópico feito a partir do OE de uma planta brasileira. O novo medicamento, denominado Acheflan[®], tem como princípio ativo o sesquiterpeno α -humuleno e entrou no mercado no primeiro semestre de 2005. Novas apresentações do Acheflan estão em estudo e serão lançadas. A forma aerosol do antiinflamatório será lançada ainda em 2006, já a via sistêmica do medicamento requer um período mais longo de pesquisas e tem previsão de lançamento para 2008.

2.2 Metabólitos secundários e óleos essenciais.

As plantas produzem uma vasta diversidade de compostos orgânicos (CROTEAU *et al.*, 2000). Muitos desses compostos são economicamente importantes, tais como, óleos essenciais, alcalóides, resinas, taninos, entre outros. Por uma questão de conveniência os compostos químicos de plantas são classificados em primários e secundários, sendo os primários amplamente distribuídos, ocorrendo na maioria dos organismos e fundamentais para o desenvolvimento da planta. Apresentam-se em altas concentrações e, de uma forma geral, possuem baixo valor de comercialização (BALANDRIN *et al.*, 1985).

Os metabólitos secundários são sintetizados a partir de metabólitos primários e apresentam distribuição limitada, sendo restritos a grupos taxonômicos particulares (BALANDRIN *et al.*, 1985). As funções dos metabólitos secundários estão relacionadas a um papel ecológico: atração de polinizadores, respostas químicas a

estresse ambiental, defesas químicas contra microrganismos, insetos, outros predadores e mesmo contra outras plantas (CROTEAU *et al.* 2000; LEÓN *et al.* 2001; PHILLIPS & CROTEAU, 1999; TRAPP & CROTEAU, 2001).

Compostos secundários, geralmente sintetizados em células especializadas, são encontrados em pequenas quantidades e geralmente alcançam valores maiores na comercialização, em comparação com os metabólitos primários, devido a maior raridade de sua disponibilidade (BALANDRIN *et al.*, 1985).

Com base em sua origem metabólica, os produtos naturais de plantas podem ser divididos em três grupos majoritários: Os terpenóides ou terpenos, os alcalóides e os compostos fenólicos (CROTEAU *et al.*, 2000).

Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias químicas derivadas de unidades de isopreno. Sua nomenclatura e classificação refletem o número de unidades de isopreno presentes (SIMÕES & SPITZER, 2000). Os monoterpenos constituem uma classe simples de isoprenóides com estrutura de 10 carbonos, constituída por 2 unidades isopreno. Os sesquiterpenos apresentam 15 carbonos e são formados com a união de 3 unidades de isopreno, os diterpenos são formados por 20 carbonos, os triterpenos e tetraterpenos são formados respectivamente por 30 e 40 átomos de carbono com 6 e 8 unidades de isopreno (CROTEAU *et al.*, 2000).

A biossíntese de isoprenos em plantas se processa por duas vias independentes (Fig. 4): a clássica via do acetato/mevalonato, que ocorre no citosol onde são sintetizados os sesquiterpenos, triterpenos

e esteróides; e a via do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOX-P), que ocorre nos plastídios onde são sintetizados mono e diterpenos, carotenóides e o fitol. (LICHTENTHALER, 1999).

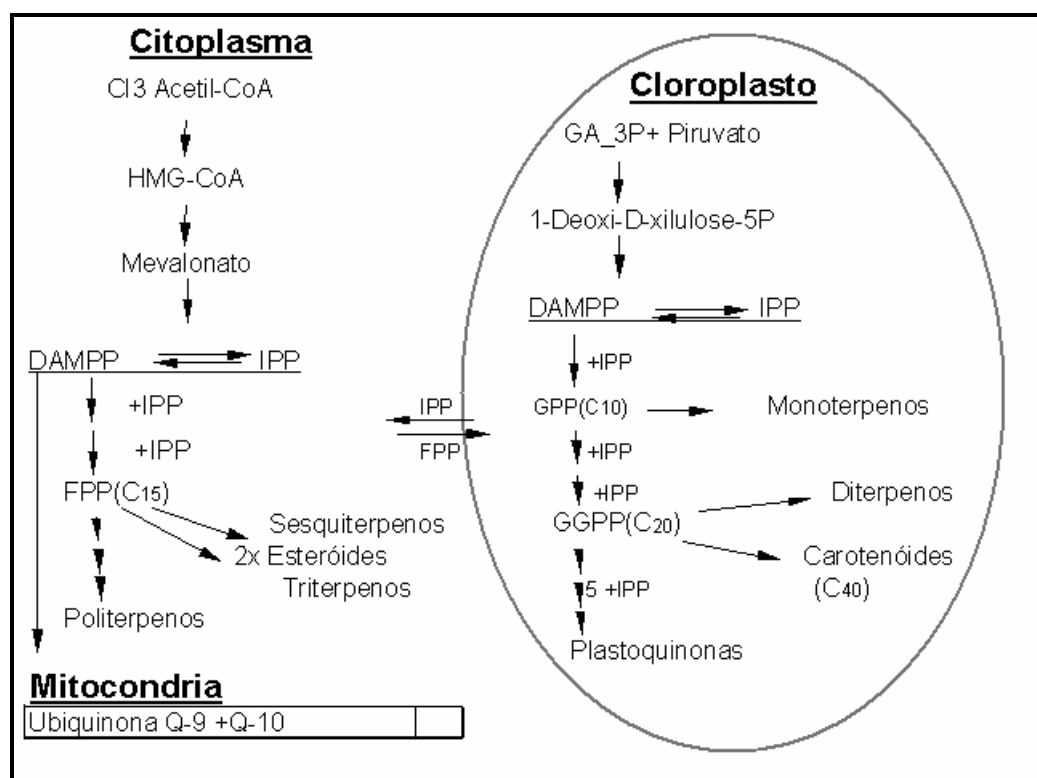


Figura 4. Esquema da biossíntese de terpenos (LICHTENTHALER, 1999).

A ISO “International Standard Organization”, define os OEs como as substâncias produzidas por vegetais obtidas através de destilação por arraste a vapor (SIMÕES & SPITZER, 2000). São produzidos em estruturas anatômicas e celulares definidas, como tricomas glandulares, por exemplo (CROTEAU *et al.*, 2000). De modo geral, são substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Normalmente são sintetizados nas folhas e constituídos basicamente por mono e sesquiterpenos (CROTEAU *et al.*, 2000; SIMÕES & SPITZER, 2000).

Os monoterpenos constituem a subclasse que inclui compostos muito comuns em óleos essenciais como o α -pineno, mentol, citral, linalol, cânfora, carvacrol, dentre outros de ampla utilização na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (SIMÕES & SPITZER, 2000).

Os sesquiterpenos geralmente ocorrem junto aos monoterpenos em óleos essenciais, mas em quantidades menores. Em geral são menos voláteis do que os monoterpenos. Estima-se que existam cerca de 1000 sesquiterpenos componentes de óleos essenciais (SIMÕES & SPITZER, 2000).

O OE de *C. verbenacea* é composto basicamente por monoterpenos e sesquiterpenos. Entre seus constituintes pode-se citar o α -pineno, o aloaromadendreno, o trans-cariofileno, o α -humuleno e o β -gurjuneno (DE CARVALHO JR *et al.*, 2004).

Em função da crescente valorização dos metabólitos secundários, pesquisas procuram investigar formas de maximizar a quantidade de óleo essencial produzido por plantas sem a perda de sua qualidade, ou seja, mantendo a concentração ideal de seus constituintes químicos de interesse, podendo, dessa forma, otimizar a produção de fármacos, melhorando a qualidade do produto sem acarretar custos adicionais ao processo produtivo (SILVA, 2005).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- AKISUE, M.K., OLIVEIRA, F., MORAES, M.S., AKISUE, G. & MANCINI, B. (1983). *Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura se Cordia verbenacea D.C.-Boraginaceae*. Revista de Ciências Farmacêuticas. 5: 69–82.
- ALVES, L.F. (2005). *Laboratory of Flora Medicinal: a landmark in the study of medicinal plants in Brazil*. Fitos. 1(2):30-40.
- ALMEIDA, F.R.F. (1998). *Cresce o mercado das plantas medicinais*. Conjuntura econômica. 52(4): 43-44.
- BALANDRIN, M.F., KLOCKE, J.A., WURTELE, E.S. & BOLLINGER, W.H., (1985). *Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials*. Science. 228 (4704): 1154-60.
- BARROSO, I., OLIVEIRA, F., KATO, E. T. M. & DIAS, T.G. (2002). *O gênero Cordia L.: botânica, química e farmacologia*. Lecta. 20(1):5-34.
- BAYEUX, M.C., FERNANDES, A.T. & FOGLIO, M.A., ET AL. (2002) *Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from Cordia curassavica DC*. Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research. 35 (10):1229-1232.
- CALIXTO, J.B. (2000). *Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 33 (2):179-89.
- CAPASSO, R., IZZO, A.A., PINTO, L., BIFULCO, T., VITO BELLO, C. & MASCOLO, N. (2000). *Phytotherapy and quality of herbal medicines*. Fitoterapia. 1: S 58-65.
- CHAVES, F.C.M. (2002). *Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (Ocimum gratissimum L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte*. Tese

(Doutorado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas,
Universidade Estadual Paulista, Botucatu. SP.

- CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M. & LEWIS, N.G. (2000). *Natural products (Secondary metabolites)*. In: *Biochemistry and molecular biology of plants*. BUCHANAN, B.B., WILHELM GRUISSEM, W., RUSSELL, L. J. (editores). Rockville: American Society of Plant Physiologists: 1250-1268.
- DE CARVALHO JR, P.M., RODRIGUES, R.F., SAWAYA, A.C., MARQUES, M.O. & SHIMIZU, M.T. (2004). *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Cordia verbenacea D.C.* Journal of Ethnopharmacology. 95: 297–301.
- FRESENIUS, G. (1857). *Cordia*. In: MARTIUS, C.F.P.V., EICHLER, A.W. & URBAN, I. (editores). Flora brasiliensis. Monachii, Lipsiae, v.8, pars 1, 1-26.
- HERNANDEZ, T., CANALES, M., TERAN, B., AVILA, O., DURAN, A., GARCIA, A.M., HERNANDEZ, H., ANGELES-LOPEZ, O., FERNANDEZ-ARAIZA, M. & AVILA, G. *Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of Cordia curassavica (Boraginaceae)*. Journal Ethnopharmacology. No prelo.
- HOAREAU, L. & DA SILVA, E.J. (1999). *Medicinal plants: a re-emerging health aid*. Electronic Journal of Biotechnology 2 (2).
- JORGE, L.I.F., MARKAMAN, B.E.O., GONZALEZ, E. & FERRO, V.O. (1998). *Identificação de Cordia verbenacea D.C. (erva baleeira) como fitoterápico*. Revista Brasileira de Farmácia. 79: 69–71.
- LEÓN, J., ROJO, E. & SÁNCHEZ-SERRANO, J. (2001). Wound signaling in plants. Journal of Experimental Botany. 52 (354): 1-9.
- LICHTENTHALER, H.K. (1999). *The 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants*. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50: 47-65.

- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. (2002) *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo. Instituto Plantarum: 100-101.
- MAGALHAES, P. M., FIGUEIRA, G. M. & MONTANARI JUNIOR, I. (2004). *Influence of NPK fertilization on Cordia verbenacea DC. biomass yield*. In: III International Symposium Breeding research on Medicinal and Aromatic Plants. 1: A3-31.
- MONTANARI JUNIOR, I. & MAGALHAES, P.M. (2004). *Production of Cordia verbenacea DC according to their plantation density*. In: III ISMAP. III International Symposium Breeding research on medicinal and aromatic plants. 1: A3-38.
- NEVES, M. C. M. (2001) *Plantas medicinais: diagnóstico e gestão*. Ed. IBAMA. Brasília. 52.
- PASSOS, G.F., FERNANDES, E.S., CUNHA, F.M. da, FERREIRA, J., PIANOWSKI, L.F., CAMPOS, M..M.. & CALIXTO, J.B. (2006). *Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from Cordia verbenacea*. Journal of Ethnopharmacology. No prelo.
- PHILLIPS, M.A. & CROTEAU, R.B. (1999). *Resin-based defenses in conifers*. Trends in Plant Science. 4(5): 184-190.
- ROUT, G.R. & SAMANTARAY, S.P. (2000) *In vitro manipulation and propagation of medicinal plants*. Biotechnology Advances. 18 (2):91-120.
- SERTIÉ, J.A.A., BASILLE, A.C., PANIZZA, S., MATIDA, A.K. & ZELNIK, R. (1990). *Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin*. Planta Medica. 56: 36–40.
- SHU, Y.Z. (1998). *Recent natural products based drug development: pharmaceutical industry perspective*. Journal of Natural Products. 61 (8): 1053-71.

- SILVA, F. da. (2005) *Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de plantas medicinais submetidas a processos de secagem e armazenamento*. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- SIMÕES, C.M.O. & SPITZER, V. (2000). *Óleos voláteis*. In: *Farmacognosia da planta ao medicamento*. SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A, PETROVICK, P. R. (editores) 2 ed. Porto Alegre-Florianópolis: Ed. Da UFSC: 387-416.
- TICLI, F. K., SOARES, A. M., PEREIRA, P.S. & SAMPAIO, S.V. (2003). *Inhibition of the myotoxic and edematogenic activity of crude Bothrops jararacussu venom and of the BthTX-I and II toxins by rosmarinic acid isolated from the plant Cordia verbenacea (Boraginaceae)*. Toxicology Letters. 144(1):69.
- TICLI, F.K., HAGE, L.I., CAMBRAIA, R.S., PEREIRA, P.S., MAGRO, A.J., FONTES, M.R., STABELI, R.G., GIGLIO, J.R., FRANCA, S.C., SOARES, A.M. & SAMPAIO, S.V. (2005). *Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from Cordia verbenacea (Boraginaceae): antiserum action*. Toxicon. 46(3):318-27.
- TRAPP, S. & CROTEAU, R. (2001). *Defensive resin biosynthesis in conifers*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 689-724
- VEIGA JR, V. F., PINTO, A.C. & MACIEL, M.A.M. (2005) *Medicinal plants: safe cure?* Química. Nova. 28(3): 519-528.
- VELDE, V.V., LAVIE, D., ZELNIK, R., MATIDA, A.K. & PANIZZA, S. (1982). *Cordialin A and B, two new triterpenes from Cordia verbenacea D.C.* Journal of the Chemical Society. 1: 2697–2700.

CAPITULO 1

Efeito da nutrição mineral no desenvolvimento da planta, produção e composição química do óleo essencial de *Cordia verbenacea*.

1. INTRODUÇÃO.

Diferentes componentes ambientais influenciam no teor e composição química dos óleos essenciais. Dentre esses fatores pode-se citar a qualidade de solos (propriedades físicas e químicas), disponibilidade de nutrientes (CHAVES, 2002), a luz (intensidade e fotoperíodo), a latitude, o clima e a sazonalidade (LIMA, 2003; MOLE & WATERMAN, 1988).

Estudos agronômicos envolvendo plantas medicinais são de uma forma geral escassos, sobretudo os relacionados a espécies arbustivas como *C. verbenacea*. Investigações nesta área se concentram, sobretudo, em espécies da família Lamiaceae devido à riqueza e ampla aplicação de seus óleos essenciais (CHAVES, 2002).

O efeito da nutrição mineral sobre o desenvolvimento vegetal, a composição e rendimento do OE de *Mentha piperita* pode ser verificado em diferentes estudos. PICCAGLIA *et al.* (1993) avaliaram a resposta da planta ao cultivo com a adição de fósforo em teores de 0, 75 e 150 Kg/ha e de nitrogênio de 0, 100 e 200Kg/ha durante dois anos. Nenhum efeito foi observado com o fornecimento de fósforo, contudo o aumento no fornecimento de nitrogênio aumentou a biomassa geral e o rendimento de OE, mas diminuiu a porcentagem de folhas na biomassa. LEAL (2001) observou que o fornecimento de N nas concentrações de 263 e 315 mg/L, correspondentes a um acréscimo de 25% e 50% do nutriente presente na solução nutritiva de Hoagland e Arnon, reduziram o desenvolvimento, a produção e a qualidade da composição do óleo essencial da planta. As plantas submetidas às maiores concentrações de nitrogênio apresentaram

menor quantidade de OE, diminuição do comprimento da parte aérea, da área foliar e das massas secas do caule, folhas, raiz e total.

VALMORBIDA (2003) avaliou a influência da concentração de potássio no desenvolvimento da planta e produção de OE em *Mentha piperita*. As plantas foram cultivadas em 3 diferentes concentrações de potássio: solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (234mg/L de K), solução completa menos 50% (117mg/L) e menos 75% de potássio (58,50mg/L). As menores concentrações de potássio não reduziram o desenvolvimento da planta e a produção de OE.

RODRÍGUES *et al.* (2004) avaliaram o efeito da concentração de fósforo sobre o crescimento e os teores de óleo essencial de *Mentha piperita* L. Trabalharam com duas épocas de coleta: 65 e 95 dias de cultivo e com as seguintes concentrações de P: 6, 12, 18, 24 e 30mg /L. Aos 95 dias de cultivo, o aumento da concentração de P aumentou significativamente as massas secas das partes e total e também os teores de OE. Observou-se que a concentração de P de 30mg/L em relação à de 19,48 mg/L, promoveu um aumento da MSF (24,70%), mas reduziu o teor foliar de óleo (26,33%) possivelmente pela ocorrência de diluição do óleo essencial pela maior quantidade de matéria seca presente nas folhas. A concentração de P que proporcionou o teor máximo de OE foi de 19,48 mg/L. Os autores concluíram que, dependendo da adubação utilizada, é possível a extração da mesma quantidade de OE com uma menor massa de folhas a ser processada pela indústria.

A variação na nutrição mineral também mostrou sua ação sob a biomassa de folhas e produção de OE de *Eucalyptus citriodora*. As omissões no fornecimento de N e B comprometeram a produção de

folhas, resultando numa menor produção de OE por planta. A ausência de potássio foi a única que influenciou a composição de OE (MAFFEIS *et al.*, 2000).

O efeito da adubação química e da calagem no crescimento e na nutrição da erva-baleeira (*Cordia verbenacea*) foi avaliado por ARRIGONI-BLANK e colaboradores (1999). Os tratamentos usados foram: completo (adubação com N, P, K, S, B, Cu, Fe, Zn e calagem); completo sem calagem; completo exceto cada nutriente e somente solo. Observou-se que, no cultivo da erva-baleeira em solos ácidos e de baixa fertilidade, a calagem e a adubação são essenciais para o seu crescimento.

O cultivo de *C. verbenacea* pode ser considerado recente e há uma escassez de dados e pesquisas que avaliem o desenvolvimento da planta e a resposta em relação ao princípio ativo de interesse.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Avaliar o desenvolvimento de *C. verbenácea* cultivada em solução nutritiva em função dos tratamentos com omissão no fornecimento de N, P, K e B, bem como da suplementação de N e P.
- ✓ Verificar a influência do estresse nutricional sobre a produção de óleo essencial;
- ✓ Avaliar a composição química do óleo essencial por Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) de acordo com os tratamentos nutricionais;
- ✓ Verificar o efeito da nutrição mineral sobre a porcentagem do princípio ativo α -humuleno, componente do OE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal:

As sementes de *C. verbenacea* utilizadas na produção de mudas, gentilmente cedidas pela Divisão de Agrotecnologia, foram provenientes de um cultivo realizado no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP) situado na cidade de Paulínia, latitude sul 22° 48', aproximadamente 700m de altitude. Uma exicata da espécie esta depositada no Herbário da Universidade Estadual de Campinas, sob o número UEC 112744 Fernando de Oliveira (identificador).

As sementes foram semeadas em tubetes plásticos de polipropileno utilizando-se substrato orgânico comercial. Foram colocadas 3 sementes em cada tubete, com a realização de desbaste após a germinação. A germinação começou cerca de 1 mês após a semeadura.



Figura 5. Muda de *C. verbenacea* utilizada no experimento.

Fonte: Shimizu 2006.

As mudas (Figura 5) foram formadas em viveiro recoberto com sombrite, com irrigação por aspersão, situado na Divisão de Agrotecnologia (CPQBA-UNICAMP). Após 60 dias, as mudas foram transferidas para casa de vegetação do Departamento de Fisiologia Vegetal (Instituto de Biologia-UNICAMP) e transplantadas para vasos de 5L com pratos em baixo. O substrato utilizado foi areia lavada com água durante 12h. Para o controle das condições de fertilidade uma amostra do substrato utilizado nos vasos foi enviada ao laboratório de Análise de Solos do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Antes da transferência, as mudas foram lavadas em água corrente para a retirada de substrato aderido às raízes.

3.2. Experimentos

3.2.1. Experimento 1: Omissão no fornecimento de Nitrogênio, Potássio, Fósforo, Boro e suplemento de N.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação de maio até agosto de 2005. A temperatura do ar no período oscilou entre a máxima de 38°C e a mínima de 12°C. A luminosidade foi avaliada com um sensor LI190 A acoplado a um data logger LI-1000. Os valores oscilaram entre 970,6 e 1154,29 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, a luminosidade no ambiente externo oscilou entre 1844 e 2318 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Os valores foram obtidos em dias ensolarados por volta das 12h.

As mudas foram sorteadas e submetidas aos tratamentos descritos na Tabela 1. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 repetições em cada tratamento. Foram realizadas

3 extrações de OE com agrupamento de folhas de 4 plantas. A composição das soluções nutritivas utilizadas está descrita na Tabela 1.

No início de experimento, 12 plantas tiveram suas alturas tomadas e foram coletadas para obtenção da massa da matéria seca.

3.2.2. Experimento 2: Suplemento de Nitrogênio e fósforo

Plantas mantidas em casa de Vegetação de dezembro de 2005 a março de 2006. A temperatura do ar no período oscilou entre 43º e 16º, apresentando médias altas.

Após transferência para vasos, as plantas foram sorteadas e submetidas aos tratamentos apresentados na Tabela 2. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições em cada tratamento. Foram realizadas 3 extrações de OE com agrupamento de folhas de 2 plantas. A composição das soluções nutritivas utilizadas está descrita na Tabela 2.

No início de experimento, 6 plantas tiveram suas alturas tomadas e foram coletadas com obtenção de sua massa seca e área foliar.

3.3. Coleta

Nos experimentos 1 e 2 as plantas foram coletadas aos 90 dias de tratamento, suas alturas foram tomadas e foi averiguada a massa

fresca das folhas, caule e raiz. Após secagem em estufa com circulação de ar a 45°C durante 48h², a matéria seca foi avaliada.

A coleta de plantas foi realizada pela manhã, antes das 8h para prevenir perdas de constituintes voláteis do OE, cerca de 50g de folhas de cada repetição, foram trituradas com Nitrogênio líquido e congeladas para posterior extração de OE.

3.4. Soluções nutritivas utilizadas nos tratamentos.

Foram preparadas soluções estoque (1 molar) de cada macronutriente componente das soluções nutritivas utilizadas. Para a composição de cada solução utilizada nos tratamentos (Tabelas 1 e 2), alíquotas de cada solução estoque foram combinadas e diluídas em água destilada com pH 7. Foram aplicados semanalmente 200mL de solução em cada planta.

² Em experimentos anteriormente realizados no CPQBA-UNICAMP verificamos que esta temperatura durante 48 foi suficiente para promover a perda total da umidade nos tecidos da planta.

Tabela 1. Composição química das soluções nutritivas utilizadas no experimento com omissão no fornecimento de N, P, K, e suplemento de N na concentração de 238mg/L. (SARRUGE, 1975).

Soluções estoque	Tratamentos mL/L					
	Controle	-N	-P	-K	-B	+N
KH_2PO_4 (M)	1	1			1	1
KNO_3 (M)	5		5		5	5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (M)	5		5	5	5	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (M)	2	2	2	2	2	2
KCl (M)		5	1			
CaCl_2 (M)		5				
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (M)				1		
NH_4NO_3 (M)				2		1
Micronutrientes ¹	1	1	1	1		1
Micronutrientes-B					1	
Fe-EDTA ²	1	1	1	1	1	1

Composição da solução de micronutrientes (g/L): $\text{H}_3\text{BO}_3=2,86$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}=1,81$; $\text{ZnCl}_2=0,10$; $\text{CuCl}_2=0,04$; $\text{H}_2\text{MoO}_4=0,02$.

² Para o preparo da solução de ferro foram dissolvidos 33,3g de EDTA-dissódico (Na_2EDTA) em 100,4mL mL de NaOH (1N), depois de dissolvidos, foi acrescentado 25,0g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a solução foi arejada durante 24 horas e o volume foi completado para 1L com H_2O .

Tabela 2. Composição química das soluções nutritivas utilizadas nos experimentos com suplemento de N e P.

Soluções estoque	Completa*	+N'	+N''	+P'	+P''
KH_2PO_4 (M)	1	1	1	1	1
KNO_3 (M)	5	5	5	5	5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (M)	5	5	5	5	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (M)	2	2	2	2	2
NH_4NO_3 (M)		1	2		
NaH_2PO_4 (M)				0,5	1
Micronutrientes	1	1	1	1	1
Fe-EDTA	1	1	1	1	1

* Tratamento controle. +N' (238mg/L), +N''(266mg/L), +P'(45 mg/L), +P''(60 mg/l).

Para verificar o estado nutricional das plantas, amostras de 50g de folhas de cada tratamento foram enviadas ao Laboratório de Análise de Solos (IAC) para diagnose foliar de nutrientes.

3.5. Extração de óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada em sistema de hidrodestilação com aparelho do tipo Clevenger. O sistema de destilação foi refrigerado com um sistema de circulação contendo água/etanol/etilenoglicol na proporção de 2:2:1.

50g de folhas, previamente trituradas com nitrogênio líquido, foram acondicionadas, juntamente com 400mL de água destilada, em balão de fundo redondo de 1L. Utilizou-se em manta de aquecimento Fisatom.

Após 2 horas de destilação, a manta de aquecimento foi desligada, o sistema foi lavado com cerca de 30mL de diclorometano³ (CH_2Cl_2) e a mistura água/óleo essencial contida no sistema coletor foi recolhida e transferida para funil de separação de 500mL. Após agitação no funil de separação, a fase orgânica foi separada e a fase aquosa restante foi re-extraída por 3 vezes com a adição de 50mL de diclorometano em cada vez. A fase orgânica total resultante foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotativo a 45rpm sob temperatura ambiente. A massa de óleo obtida foi avaliada e seu rendimento calculado em porcentagem em relação à massa inicial de folhas.

O óleo foi diluído em acetona e transferido para balão volumétrico de 10mL. Foi adicionado a cada balão 1mL de solução de

³ Este solvente mostra-se mais apropriado para trabalhos com óleo essencial por apresentar baixo ponto de ebulição e não ser necessário aquecimento para sua evaporação. Salientamos que para um trabalho seguro com compostos clorados, além da observação de normas de segurança de laboratório é necessária especial atenção a seu descarte encaminhando o produto para empresas especializadas na incineração apropriada de compostos clorados. O produto recuperado no destilado não pode ser reutilizado.

dibutilftalato (C=2mg/mL), substância utilizada como padrão interno para a quantificação de α -humuleno.

3.6. Análise cromatográfica do óleo essencial e determinação do índice de Kovats dos compostos majoritários

Foi utilizado um cromatográfico a gás Hewlett-Packard modelo HP-6890 equipado com detector seletivo de massas HP-5975, coluna capilar HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Temperaturas: injetor=220°C, detector=250°C, coluna=60°C com aumento de 3°C/min até 240°C. Gás de arraste: Hélio com vazão de 1,0 mL/min.

Para determinar o Índice de Kovats (IK) dos componentes do OE, uma mistura de alcanos (C9-C20) foi injetada no cromatógrafo a gás e analisada sobre as mesmas condições que os óleos essenciais. O IK foi calculado para cada composto. A identificação dos compostos foi feita pela comparação dos padrões de fragmentação fornecidos pelo espectrômetro de massas com os espectros existentes no banco de dados do equipamento (biblioteca virtual NIST 05), com a literatura (ADAMS, 1995) e pelo IK.

Para o calculo do IK foi utilizada a seguinte equação:

$$IK = \frac{[(Tr_x - TrC_{n-1})(C_n - C_{n-1})] \times 100}{(TrC_n - TrC_{n-1})} + 100C_{n-1} \quad \text{onde:}$$

Tr_x	Tempo de retenção (TR) da amostra;
TrC_n	TR do Hidrocarboneto com “n” carbonos;
TrC_{n-1}	TR do Hidrocarboneto com “n-1” carbonos;
C_n	Número de carbonos do hidrocarboneto “n”;
C_{n-1}	Número de carbonos do hidrocarboneto “n-1”.

Para a quantificação de α -humuleno, as amostras foram injetadas no módulo SIM do cromatógrafo a gás. Foram preparadas curvas analíticas com o padrão de α -humuleno com sete pontos, com concentrações variando entre $2\mu\text{m/mL}$ e $78\mu\text{m/mL}$. Para o α -humuleno foram monitorados os íons 93 (íon de quantificação), 60, 121 e 204 (íons de identificação). Para o padrão de dibutilftalato (DBF), foram monitorados os íons 49 (íon de quantificação), 104, 150 e 223 (íons de identificação).

3.7. Análise de crescimento

Diversos parâmetros (citados abaixo) foram medidos e avaliados para fornecer informações sobre o desenvolvimento da planta⁴. Os parâmetros foram calculados seguindo HUNT (1982). A área foliar foi avaliada com o auxílio de um medidor de área foliar LI-3100 (Li-Cor, Inc.NE).

3.7.1. Comprimento da parte aérea

Altura em centímetros da parte aérea até a gema apical.

⁴ Para o experimento 1 não foram considerados os parâmetros referentes à área foliar.

3.7.2. Massa da Matéria Seca (MS)

A massa da matéria seca de cada órgão foi determinada em gramas. A massa seca total (MST) correspondeu à soma das massas de todos os órgãos. A massa seca da parte aérea corresponde à somatória das massas do caule e folhas.

3.7.3. Taxa de assimilação líquida (TAL)

A TAL que expressa a taxa de fotossíntese líquida, em termos de massa seca produzida, em gramas, por dm^2 de área foliar, por unidade de tempo, foi obtida pela seguinte equação:

$$TAL = \frac{(MT2 - MT1)(LnA2 - LnA1)}{(A2 - A1)(T2 - T1)} \quad \text{onde:}$$

MST2	massa seca total final;
MST1	massa seca total inicial;
A2	área foliar final;
A1	área foliar inicial;
Ln	logaritmo neperiano;
T2	tempo final.
T1	tempo inicial.

3.7.4. Taxa de crescimento relativo (TCR)

A TCR, que reflete o aumento da matéria orgânica em um intervalo de tempo, dependendo da matéria pré-existente, foi

obtida pela seguinte equação:

$$TCR(g / g / dia) = \frac{(LnMT2 - LnMT1)}{(T2 - T1)} \quad \text{onde:}$$

MST2 massa seca total final;

MST1 massa seca total inicial;

T1 tempo final;

T2 tempo inicial.

3.7.5. Razão raiz parte aérea (R/PA)

A razão raiz/Parte aérea foi calculada pela equação:

$$R / PA = \frac{MR}{MPA} \quad \text{onde:}$$

MSR massa seca da raiz;

MSPA massa seca da parte aérea

3.7.6. Razão de área foliar (RAF)

A RAF foi definida como razão da área foliar (AF) pela massa seca total da planta (MST)

$$RAF = \frac{AF}{MST}$$

3.7.7. Área foliar específica (AFE)

A AFE relaciona a área foliar com a massa seca das folhas e foi obtida pela seguinte equação.

$$AFE = \frac{AF}{MSF}$$

3.8. Avaliação de sintomas de deficiências minerais

Durante os experimentos, cada indivíduo foi observado quanto às características morfológicas e sintomas visuais.

3.9. Análise estatística dos dados

Para a análise estatística os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando os testes F, no programa SAS, e posteriormente, ao teste para comparações múltiplas de Tukey utilizando-se o nível de 5% de significância.

As pressuposições de independência, homogeneidade da variância e normalidade dos resíduos foram verificadas, validando as análises feitas.

4. RESULTADOS

4.1 Sintomas de deficiências minerais observados

Abaixo são apresentados os principais sintomas visuais observados nas plantas de cada tratamento. Os sintomas são descritos na ordem de seu aparecimento.

Controle (C) - Folhas em geral intensamente verdes. Folhas paralelas ao chão ou levemente voltadas para baixo. Folhas velhas, em alguns casos, apresentando pecíolo voltado para baixo (Figura 6 A).

Omissão de Nitrogênio (-N) - Os sintomas de carência deste nutriente foram os primeiros a se manifestar. Inicialmente as folhas mais velhas perderam a cor verde intensa e passaram a apresentar uma coloração verde clara (Figura 6 C). Posteriormente as folhas jovens também apresentaram a mesma coloração. Num estágio mais avançado de desnutrição, as folhas velhas começaram a apresentar intensa clorose. Em comparação com os demais tratamentos, as folhas apresentaram em geral, menor lâmina e as plantas apresentaram menor altura e menor número de ramificações.

Suplemento de nitrogênio (+N)- Folhas em geral, intensamente verdes. Pecíolo voltado para baixo em folhas velhas. Ramificação terciária. Plantas altas, em caso de menor altura, maior ramificação.

Omissão de Boro (-B)- Inicialmente folhas jovens apresentaram lâmina e pecíolos voltados para baixo. Este sintoma foi observado posteriormente na maioria das folhas inclusive em brotos. Este sintoma foi encontrado em folhas velhas de outros tratamentos, contudo, foi mais intenso neste (Figura 6 D e E). Embora a altura da planta se assemelhasse com as dos demais tratamentos, grande número de plantas apresentou tombamento com necessidade de sustentação por estacas. Algumas folhas apresentaram uma coloração mais escura no limbo de uma forma geral (amarronzada) e mais clara (amarelecidas) nas nervuras. Foram observadas algumas folhas verdes caducas e morte de gema apical de 4 plantas.

Omissão de potássio (-K)- Algumas folhas apresentaram limbo escurecido e região próxima das nervuras amareladas. Pecíolo de folhas velhas voltados para baixo. Maioria das folhas verdes. Plantas tombadas com necessidade de sustentação por estacas (figura 6 B).

Omissão de fósforo (-P)- Folhas velhas com pecíolo voltado para baixo raramente com a lâmina no mesmo sentido, este sintoma apresentou-se em menor escala que no tratamento **-B**, assim como a queda de folhas verdes. Gema apical atrofiada e caduca em algumas plantas (3). Maioria das folhas intensamente verdes, em alguns casos a lâmina foliar se apresentou com coloração escurecida (marrom) com nervuras amarelecidas (Figura 6 B).

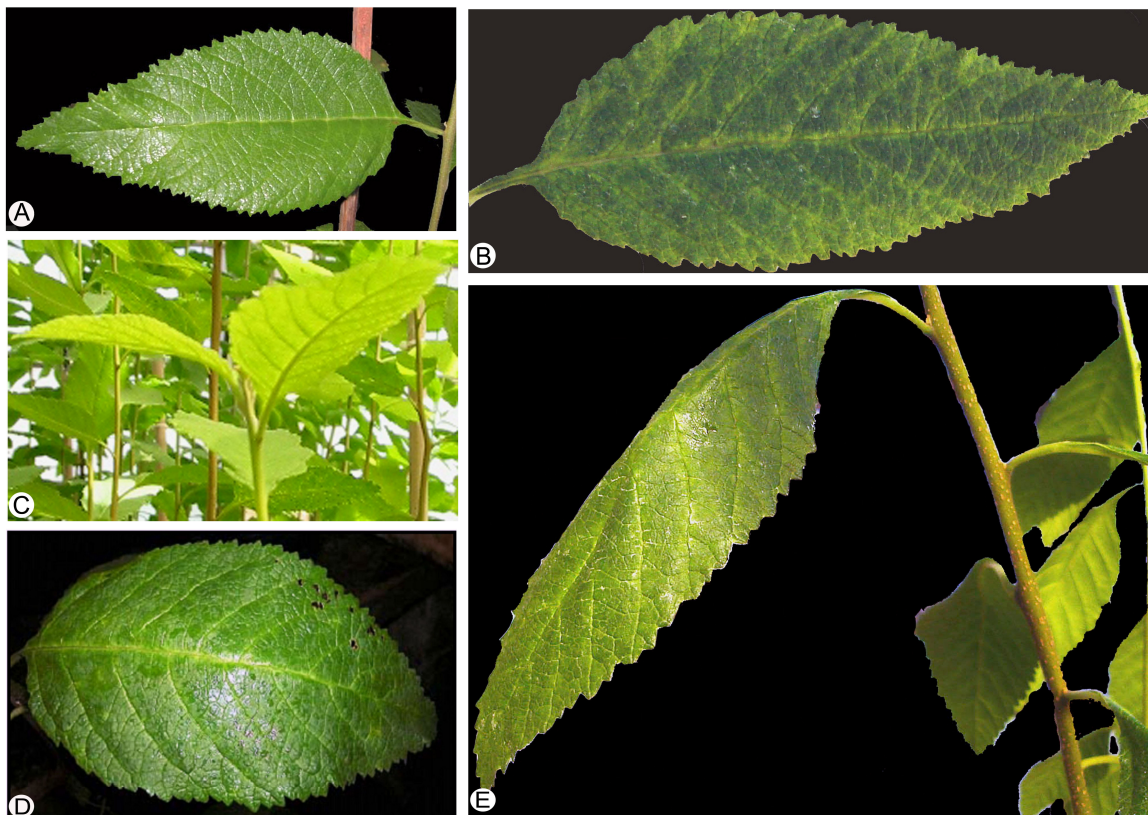


Figura 6. Folhas de *C. verbenacea* com sintomas de deficiências minerais. (A) aspecto de folha do tratamento controle; (B) limbo escurecido observado em plantas dos tratamentos com omissão no fornecimento de P, B e K; (C) coloração de folhas predominante no tratamento com omissão no fornecimento de N; (D) e (E) deformações observadas na lâmina foliar do tratamento com omissão no fornecimento de B. Fonte: Shimizu 2006.

Suplemento de P' (45mg/L) - Clorose na base e internerval, folhas velhas com clorose, algumas folhas jovens também com este sintoma, margens escurecidas.

Suplemento de P''(60mg/L) - Clorose internerval, clorose na base, Necrose e folhas escurecidas em algumas regiões. Pontuações clóroticas em lâminas. Margens escuras e necrose marginal em algumas folhas. Pecíolo e algumas lâminas voltadas para baixo. Sintomas em folhas velhas e jovens. Caule frouxo (Figura 7 A).

Suplemento de N (238 mg/L) - Folhas intensamente verdes, folhas com clorose na base. Maior perda de água, murchamento.

Suplemento de N (266 mg/L) - Plantas em geral com folhas com pontuações clóroticas. Perda mais rápida de água, murchamento. Algumas lâminas com pontos escurecidos. Ramificação terciária (Figura 7 B).



Figura 7. Folhas de *C. verbenacea* em função do excesso de minerais. (A) Necrose marginal em folhas submetidas a suplemento de P. (B) Pontuações cloróticas visualizadas em folhas submetidas a suplemento de P ou N (266 mg/L). Fonte: Nascimento 2006.

4.2. Diagnose de macro e micronutrientes em folhas de *C. verbenacea*

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os valores referentes às concentrações foliares de macro e micronutrientes em folhas de *C. verbenacea*.

Tabela 3. Teores de macronutrientes em folhas de *C. verbenacea* em função da nutrição mineral.

Tratamento Nutriente						
	Controle	+N	-N	-K	-P	-B
N (g/Kg)	31,2	29,7	15,9	27,7	25,1	32,1
K (g/Kg)	22,0	26,6	17,7	12,9	22,5	22,5
P (g/Kg)	5,3	6,4	6,1	2,4	3,6	2,1
Ca (g/Kg)	33,8	33,5	43,3	37,1	40,5	32,8
Mg (g/Kg)	4,7	5,1	5,0	6,0	5,5	4,7

Tabela 4. Teores de micronutrientes em folhas de *C. verbenacea* em função da nutrição mineral.

Tratamento Nutriente						
	Controle	+N	-N	-K	-P	-B
B (mg/Kg)	60,9	63,6	80,3	66,8	70,5	24,3
Cu (mg/Kg)	6,3	6,4	4,7	6,1	5,9	6,7
Fe (mg/Kg)	251	246	312	268	257	255
Mn (mg/Kg)	225	232	286	267	229	159
Zn (mg/Kg)	28,4	24	30,3	22,9	28,6	27,2

Em comparação ao controle (100%), a contração foliar de nitrogênio no tratamento com omissão no fornecimento de N foi cerca de 50% inferior. Já as concentrações de K, P e B corresponderam respectivamente a 58,6% 67,9% e 30% das concentrações encontradas no controle. As menores concentrações de P encontradas nos tratamentos com omissão de K e B corresponderam a 45,2% e 39,6% das concentrações encontradas no controle.

4.3. Rendimento e composição química do OE

Em relação ao rendimento de OE, os tratamentos do experimento 1 apresentaram 3 níveis de resposta, a maior média foi

encontrada no **Controle (C)** (0,15%), sendo esta estatisticamente equivalente à apresentada por **+N** (0,12%). A menor média foi observada em **-N** (0,03%), sendo esta estatisticamente equivalente aos tratamentos **-B** (0,08%), **-K** (0,07%) e **-P** (0,07%). O percentual de α -humuleno foi equivalente entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Rendimento de óleo essencial (OE) e porcentagem de α -humuleno em *C. verbenacea* em função da nutrição mineral.

Tratamento	Rendimento OE(%)	α -humuleno(%)
Controle	0,15 a*	5,14 a
+ N**	0,12 a	6,05 a
-N **	0,03 c	3,92 a
-K **	0,07 bc	3,47 a
-P **	0,07 bc	2,80 a
-B **	0,08 bc	4,08 a

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (segundo teste deTukey, com nível de significância de 5%).** Suplemento de N (238mg/L). Omissão no fornecimento de N, P, K e B.

O tratamento com suplemento de P (60mg/L) mostrou um aumento significativo na produção de OE em relação ao controle, mas em relação ao teor de α -humuleno sua resposta foi inferior ao controle (Tabela 6). O suplemento de N nas duas concentrações estudadas não influenciou significativamente o rendimento de OE e os teores de α -humuleno (Tabela 7).

Tabela 6. Rendimento de óleo essencial (OE) e porcentagem de α -humuleno em *C. verbenacea* em função das concentrações de P presentes nas soluções nutritivas utilizadas.

Tratamento	Rendimento OE(%)	α -humuleno(%)
Controle	0,31 b*	0,14 a
+P (45mg/L)	0,28 b	0,23 a
+P (60mg/L)	0,56 a	0,12 b

*Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si (segundo teste deTukey, com nível de significância de 5%). Suplemento de N (238mg/L). Omissão no fornecimento de N, P, K e B.

Tabela 7. Rendimento de óleos essenciais (OE) e porcentagem de α -humuleno em *C. verbenacea* em função das concentrações de N presentes nas soluções nutritivas utilizadas.

Tratamento	Rendimento OE(%)	α -humuleno(%)
Controle	0,31 a*	0,14 a
+N (238mg/L)	0,35 a	0,08 a
+N (266mg/L)	0,25 ab	0,16 a

*Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si (segundo teste deTukey, com nível de significância de 5%). Suplemento de N (238mg/L). Omissão no fornecimento de N, P, K e B.

Os compostos mais abundantes encontrados nas amostras analisadas por GC-MS estão descritos nas Tabelas 8 e 9. Entre os compostos mais abundantes presentes no OE de *C. verbenacea* pode-se citar: α -pineno, Trans-cariofileno, santaleno, α -humuleno, Germacreno B e ainda um sesquiterpeno de massa molar 218 ainda não identificado.

Tabela 8. Tempo de retenção (tR), Índice de Kovats (IK) e percentuais relativos dos compostos mais abundantes presentes no OE de *C.verbenacea* (Experimento 1).

Composto	tR (min)	IK	C*	-P	-K	-B	+N
3-Hexene-ol	3,616	-	0,79	1,66	2,85	3,62	4,49
α -pineno	5,221	932	29,05	5,28	8,37	12,1	7,97
Trans-cariofileno	23,39	1419	17,8	18,12	15,95	18,84	15,19
santaleno	23,46	1419	9,23	10,95	6,24	7,87	8,66
α -humuleno	25,04	1452	5,37	3,01	3,97	4,34	8,20
Germacreno D	26,15	1478	2,89	3,86	1,72	1,66	3,98
δ -Cadineno	27,57	1522	3,24	2,71	0,98	2,51	2,49
γ - Bisaboleno	27,90	1531	1,64	1,14	3,38	1,54	0,89
Germacreno B	33,10	1669	3,94	5,41	7,29	4,89	3,84
Sesquiterpeno M=218	33,38	1677	6,15	8,52	8,09	7,08	6,01

*C Tratamento controle. +N (238mg/L), -P, -K, -B, -N representam tratamentos com omissão no fornecimento desses nutrientes.

Tabela 9. Tempo de retenção (tR), Índice de Kovats (IK) e percentuais relativos dos compostos mais abundantes presentes no OE de *C.verbenacea* (Experimento 2).

Composto	tR (min)	IK	C*	+N'	+N''	+P'	+P''
3-Hexene-ol	3,73	-	8,41	3,16	3,59	5,39	3,44
α-pineno	5,04	933	11,44	5,82	11,07	10,76	8,52
Trans-cariofileno	23,68	1418	21,16	23,36	15,87	12,74	14,27
santaleno	23,78	1419	11,65	10,84	9,54	6,15	8,76
α-humuleno	25,06	1452	7,62	7,39	4,30	3,61	4,49
Sesquiterpeno M=204	25,22	1455	1,67	2,29	2,64	3,32	2,68
Alloaromadendreno	25,33	1458	4,54	8,77	6,68	4,89	2,44
Germacreno-D	26,15	1478	4,00	2,29	2,31	2,63	1,63
β- Bisaboleno	27,29	1507	2,19	5,29	3,26	3,40	3,49
δ-Cadineno	27,85	1519	10,5	2,69	1,08	4,43	2,57
Sesquiterpeno M=218	33,39	1674	3,91	4,10	5,35	7,68	4,48
Sesquiterpeno oxigenado. M=218	33,66	1675	5,61	4,12	7,54	9,27	4,36

*C Tratamento controle. +N' (238mg/L), +N''(265mg/L), +P'(45 mg/L), +P''(60 mg/L)

4.4. Análise de crescimento. Fitometria

O investimento em raiz apresentou dois níveis, maiores valores nos tratamentos **+N** (15,11 g) e **C** (14,12 g), e os menores níveis em, **-P** (9,04 g), **-B** (8,58 g) e **-N** (8,58 g). sendo o valor para **-K** (11,64 g) estatisticamente igual a ambos. O tratamento com omissão no fornecimento de N apresentou os menores valores para massa seca caulinar. Pode-se também notar que a omissão no fornecimento de P e B prejudicou a formação deste órgão (Tabela 10).

A produção de folhas foi equivalente para a maioria dos tratamentos, com redução significativa de produção de

massa seca em **-P** (14,40 g) e uma redução mais severa em **-N** (7,43 g) (Tabela 10).

A relação R/PA foi maior em **-N** (0,45) e menor em **-B** (0,19). Apresentou dois níveis intermediários entre esses pólos: maiores valores para o grupo **C** (0,34), **+N** (0,31) e menores valores em **-P** (0,239) e **-K** (0,26). Os valores de TCR apresentaram respostas equivalentes, com exceção de **-N** (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação entre médias de Massa da matéria Seca (MS) (raiz, caule, folhas e total), R/PA, TCR e altura em função da nutrição mineral de *C. verbenacea*.

Tratamento	MS raiz (g)	MS caule (g)	MS folhas (g)	MS total (g)	R/PA	TCR (g/g/d)	Altura (cm)
Controle	14,12 a*	27,39ab	18,03 a	59,44 ab	0,32 b	0,02 a	1,76 a
+ N**	15,11 a	31,83 a	17,53a	64,46 a	0,31 b	0,02 a	1,67 a
-N **	8,58 b	11,71 c	7,43 c	27,73 d	0,45 a	0,01 b	1,19 b
-K **	11,64 ab	26,91ab	17,30 a	55,86 abc	0,26 cb	0,02 a	1,53 a
-P **	9,04 b	23,36 b	14,40 b	46,82 c	0,24 cb	0,02 a	1,69 a
-B **	8,58 b	24,48 b	19,51 a	52,59 bc	0,19 c	0,02 a	1,68 a

*Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si (segundo teste deTukey, com nível de significância de 5%).** Suplemento de N (238mg/L). Omissão no fornecimento de N, P, K e B.

O fornecimento de N em maiores concentrações influenciou a área foliar e a AFE. No segundo experimento, a produção de folhas, nos tratamentos com maiores concentrações de N foi menor em comparação ao Controle, ao contrário do observado no primeiro experimento para o tratamento com 238mg/L de N. A AFE aumentou de acordo com o aumento nas concentrações de N fornecidas nas soluções nutritivas (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação entre médias de Massa Seca (MS) (raiz, caule, folhas e total), R/PA, AFE, RAF, RMF, TAL, TCR e altura em função do suplemento de N.

Tratamento Caráter	Controle (210 mg/L)	+N (238 mg/L)	+N (266 mg/L)
MS raiz	8,09 a	8,57 a	9,29 a
MS caule	20,99 a	21,24 a	26,28 a
MS folhas	13,78 a	10,08 b	10,24 b
MS total	42,87 a	39,90 a	45,83 a
Altura	1,60 a	1,54 a	1,54 a
Área foliar	2615,36 b	2559,96 b	3226,76 a
R/PA	0,23 a	0,28 a	0,27 a
RAF	60,78 a	64,64 a	77,78 a
AFE	189,39 c	255,11 b	310,52 a
RMF	32,16 a	23,72 a	23,51 a
TAL	6,70 a	6,34 a	6,31 a
TCR	0,05 a	0,05 a	0,05 a

*Médias seguidas de letra iguais na linha não diferem entre si (segundo teste de Tukey, com nível de significância de 5%).

Tabela 12. Comparação entre médias de Massa Seca (MS) (raiz, caule, folhas e total), R/PA, AFE, RAF, RMF, TAL, TCR e altura em função do suplemento de P.

Tratamento Caráter	Controle	+P (45mg/L)	+P (60mg/L)
MS raiz	8,09 a	7,86 a	7,15 a
MS caule	20,99 a	18,25 a	18,38 a
MS folhas	13,785 a	11,45 ab	9,12 b
MS total	42,87 a	37,57 a	34,64 a
Altura	1,60 a	1,36 a	1,46 a
Área foliar	2615,4 a	2751,8 a	2391,2 a
R/PA	0,23 a	0,26 a	0,26 a
RAF	60,78 a	75,67 a	71,81 a
AFE	189,39 b	254,51 a	260,25 a
RMF	32,16 a	26,51 a	21,29 a
TAL	6,70 a	5,60 a	5,91 a
TCR	0,05 a	0,05 a	0,05 a

*Médias seguidas de letra iguais na linha não diferem entre si (segundo teste de Tukey, com nível de significância de 5%).

A MS de folhas e a AFE foram afetados pelo suplemento com maiores concentrações de P. O tratamento com 60mg/L de P mostrou uma menor massa de folhas em relação ao controle e a AFE foi maior neste tratamento (Tabela 12).

5. DISCUSSÃO

Embora não haja estudos que apontem a ocorrência de deficiências minerais para a *C. verbenacea*, os sintomas observados nos tratamentos realizados coincidem com alguns relatos da literatura para outras espécies vegetais (VIEGAS *et al.*, 2004; SILVA & FALCÃO, 2002).

O tratamento com omissão no fornecimento de N levou às maiores limitações no crescimento, com menor altura, TCR, menores massas de folhas, caule e raiz. Mostrou ainda a maior relação R/PA, o que pode indicar que numa situação de carência deste nutriente a alocação de recursos entre raiz e parte aérea é afetada com indução de um maior investimento relativo em raiz. (CHAPIN III, 1980). A omissão no fornecimento de N possivelmente afetou a absorção de K, pois os teores desse elemento no tratamento **-N** foram consideravelmente inferiores ao controle, representando 66,5% dos teores encontrados no tratamento controle. Quando na forma de nitrato o N é armazenado no vacúolo e tem importante função no equilíbrio de cargas na absorção de cátions (FURLANI, 2004).

De acordo com ARRIGONI-BLANK *et al.* (1999) as omissões de N, K e B causaram as maiores quedas na produção de folhas em *C. verbenacea*. No presente estudo, essa resposta foi verificada para a omissão no fornecimento de P e N, sendo a última mais severa (Tabela 10). Contudo, a diagnose foliar mostrou que os teores de P foram baixos também nos tratamentos **-B** (2,4 g/kg) e **-K** (2,1 g/kg), nos quais não se verificou tal resposta (Tabela 3). A produção de

folhas também foi afetada pelo tratamento com suplemento de P (60mg/L).

A desnutrição de fósforo apresentada por estes tratamentos pode ser relacionada aos papéis fisiológicos de tais elementos (B e K). O potássio é o cátion mais abundante no citoplasma e apresenta importante função na regulação osmótica e balanço cátions/ânions (CHAPIN III, 1980). A deficiência em K para a espécie estudada pode ter provocado uma diminuição na absorção de fósforo ou na redistribuição desse elemento para as folhas. O Boro forma complexos com compostos da membrana celular e sua deficiência compromete a estrutura da membrana e o funcionamento de canais protéicos, prejudicando funções como a absorção de nutrientes (BLEVINS & LUKASZEWSKI, 1998).

Os teores de P encontrados nos tratamentos **-B** (2,4 g/kg) e **-K** (2,1 g/kg) foram menores que os verificados em **-P** (3,6 g/kg) (Tabela 3), o que pode ser explicado por mudanças nos mecanismos de absorção de fósforo provocadas pelo ambiente com escassez deste nutriente, favorecendo a absorção do P presente no substrato. Segundo SCHACHTMAN *et al* (1998) os mecanismos que participam da absorção de P inorgânico (Pi) não estão completamente esclarecidos, porém, o mais provável é que o Pi atravesse a membrana em co-transporte com H⁺. Há dois sistemas que podem participar da absorção de Pi com diferentes afinidades. O sistema de alta afinidade com papel preponderante na absorção de Pi em solos deficientes em fósforo, e o sistema de baixa afinidade. O sistema de alta afinidade pode ser induzido em função da concentração de Pi no

meio externo e no vacúolo o que não ocorre com o segundo que é constitutivo.

A coloração escurecida observada no limbo de plantas submetidas aos tratamentos **-B**, **-P** e **-K** pode ser atribuída à deficiência em fósforo, pois os 3 tratamentos apresentarem menores teores de P em relação ao controle. Este sintoma é descrito para diversas espécies submetidas à omissão de P (ROSOLEM & BASTOS, 1997; UTUMI *et al.*, 1999).

Em todos os tratamentos, algumas folhas apresentavam o pecíolo voltado para baixo na fase de senescência, contudo, esse sintoma foi verificado de forma mais intensa nas folhas dos tratamentos **-P** e **-B**, nas quais também se verificou que a própria lâmina estava voltada para baixo. No tratamento **-B** este sintoma era observado de uma forma mais ampla em folhas jovens. Este tratamento também apresentou folhas jovens e gema apical caducas. A observação deste sintoma na quase totalidade das folhas do tratamento com omissão de B pode dever-se também, além da desnutrição de B, à desnutrição de P presente neste tratamento. A maior parte do B das células vegetais encontra-se ligado à parede celular, por isso, os sintomas de carência deste nutriente podem se manifestar de uma forma mais ampla neste local. O B forma ésteres com grupos hidroxilas de carboidratos e glicoproteínas, interligando os polímeros da parede celular, como consequência, as folhas de plantas com deficiência em Boro são quebradiças (BLEVINS *et al.*, 1998. BOLAÑOS *et al.*, 2004). Como foi indicado na descrição dos sintomas de desnutrição observados nas plantas, algumas folhas do tratamento

com omissão no fornecimento de B apresentavam-se frágeis quebradiças, sobretudo as folhas jovens. A imobilidade do Boro no floema favorece o aparecimento de sua deficiência em tecidos jovens.

O tombamento verificado em plantas do tratamento -**B** também pode ser devido ao papel deste elemento na parede celular. Durante o crescimento da parede secundária, as paredes são reforçadas por lignina e suberina. Acredita-se que o Boro interligue duas moléculas de um polissacarídeo da parede celular chamado ramnogalacturonano II (O'NEILL *et al.*, 2001). Já o tombamento verificado em plantas do tratamento -**K** pode ser relacionado ao papel deste elemento na atividade enzimática ligada à síntese de lignina (SUELTER, 1970).

No segundo experimento, realizado de dezembro a março de 2006, o suplemento de N (238mg/L) não apresentou a mesma resposta, em relação à massa da matéria seca de folhas, (Tabela 11) observada no primeiro experimento (Tabela 10). As plantas dos tratamentos com suplemento de N apresentaram maior murchamento e conseqüente perda precoce de algumas folhas, fato que pode ser atribuído às maiores temperaturas observadas neste período. O aumento da concentração de nutrientes no vaso pode ter prejudicado a absorção de água pelas plantas, que perdiam água em maior quantidade nesta época do ano. As plantas dos tratamentos com suplemento de N apresentaram maior AFE (Tabela 11) indicando uma menor espessura de folhas. Esta relação foi maior para a aplicação de 266mg/L de N. No tratamento com suplemento de P (60mg/L) observou-se também esta tendência, menor MS de folhas e maior AFE em relação ao controle (Tabela12).

Segundo a hipótese do balanço carbono/nutriente (C/N) a concentração de metabólitos secundários com base em carbono (como terpenos e fenóis, que apresentam apenas C, H e O como componentes de suas estruturas) pode ser positivamente correlacionada com a razão C/N da planta (BRYANT *et al.*, 1983). Deficiências nutricionais moderadas limitam mais o crescimento do que a fotossíntese, por isso, plantas com deficiências nutricionais acumulariam carboidratos aumentando a razão C/N, os carboidratos acumulados em excesso são alocados para a síntese de compostos secundários com base em C (HERNS & MATTSON, 1992). Ao contrário do que observamos, seria esperado um maior teor de OE em plantas submetidas à escassez de nutrientes. Em nosso trabalho a deficiência nutricional pode ter afetado a estrutura dos tricomas onde ocorre a produção de OE. O menor rendimento de OE encontrado no tratamento com indisponibilidade de **N** pode ser atribuído a um comprometimento geral do desenvolvimento das plantas submetidas a este tratamento, já nos tratamentos **-P**, **-K** e **-B**, o menor rendimento pode estar relacionado aos baixos teores de P, elemento fundamental na biossíntese de terpenos (Figura 4). O IPP, isopentenil difosfato, é um precursor comum para todos os isoprenóides das duas vias de biossíntese de terpenos e a IPP isomerase cataliza a conversão do IPP para dimetilalil difosfato (DMAPP) para formar a unidade básica do isopreno (LICHTENTHALER, 1999).

O suplemento de P (60mg/L) ocasionou um considerável aumento na produção de OE pela planta (Tabela 6). Contudo, a massa da matéria seca de folhas apresentada neste tratamento foi inferior ao

controle e as plantas apresentaram sintomas visíveis de desequilíbrio nutricional, não apresentando um aspecto saudável, como descrito anteriormente nos sintomas observados. Num cultivo perene de *C. verbenacea* não seria viável uma aplicação desses teores de P, pois isso afetaria o desenvolvimento da planta. Seriam necessários maiores estudos variando a concentração de P fornecido às plantas para que fosse encontrada uma dosagem apropriada, a ser utilizada num plantio comercial, que aumentasse a produção de OE sem influenciar nos teores de princípio ativo e na produção de folhas. RODRÍGUES *et al* (2004) registraram um aumento na produção de OE de *Mentha piperita* com um suplemento de P equivalente a 19,48 mg/L, menor do que o recomendado pela solução padrão de Hoagland. Nos tratamentos que realizamos, o suplemento de P equivalente a 45 mg/L resultou numa produção de OE equivalente ao controle.

De forma geral, os tratamentos nutricionais não alteraram a composição do OE de *C. verbenacea*. O monoterpeno α -pineno foi o único composto a apresentar considerável diferença com maior percentual relativo no tratamento Controle, mas este composto não está relacionado a nenhuma atividade biológica já registrada para compostos da planta. No segundo experimento esta variação não foi observada.

Uma outra variação observada em algumas das amostras, contudo, sem formar um padrão para um único tratamento, foi a modificação nos percentuais relativos dos compostos de tempo de retenção 33,1, 33,4 min (33,4 e 33,7 min no segundo experimento) e

27,79⁵. Os compostos com tR 33,1, 33,4 min estão presentes na maioria das amostras analisadas, mas, em algumas amostras, estão ausentes ou em frações inferiores em relação às demais. Neste caso, observa-se a maior abundância do composto com tR (min) 27,79. Este resultado indica uma possível interação metabólica nas rotas de síntese entre esses compostos.

Os teores de N (31,2 /Kg) e K (22,0 g/Kg) encontrados no tratamento Controle estão de acordo com os relatados por ARRIGONI-BLANK (1999) para *C. verbenacea*, já os teores de P, tidos como adequados pelos mesmos autores, são inferiores aos encontrados no presente trabalho.

A escassez de estudos nutricionais com *C. verbenacea* não permite o estabelecimento de um estado nutricional adequado para a espécie, contudo, a planta aparentemente apresenta eficiência na absorção e utilização de nutrientes, pois mesmo em uma situação de omissão de nutrientes, seu crescimento, produção de massa seca, e taxa de crescimento relativo foram, em geral, pouco comprometidos.

⁵ Dado não mostrado nas Tabelas 7 e 8.

7. CONCLUSÕES

- ✓ O Nitrogênio foi o elemento que mais comprometeu o desenvolvimento da planta, ocasionando as maiores perdas de matéria seca;
- ✓ As deficiências de P e N reduziram a matéria foliar, órgão utilizado na extração de OE;
- ✓ O rendimento de OE foi menor com a omissão no fornecimento de N, P, K e B. Maiores teores de P aumentaram o rendimento de OE;
- ✓ Não foram observadas variações no teor de α -humuleno, com exceção do tratamento com suplemento de P, onde houve uma significativa redução;
- ✓ O fósforo foi o elemento que mais influenciou na biossíntese de OE.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois. Carol Stream.
- ARRIGONI-BLANK, M. de F., FAQUIN, V., PINTO, J. E. B. P., BLANK, A. F. & LAMEIRA, O. (1999). *Adubação química e calagem em erva-baleeira (Cordia verbenacea)*. Horticultura Brasileira. 17(3): 211-215.
- BLEVINS, D.G. & LUKASZEWSKI, K.M. (1998). *Boron in plant structure and function*. Annual Review of Plant Biology. 49: 481-500.
- BOLAÑOS, L., LUKASZEWSKI, K., BONILLA, I. & BLEVINS, D. (2004). *Why boron?* Plant Physiology and Biochemistry. 42 (11): 907-912.
- BRYANT, J.P., CHAPIN III, F.S., KLEIN, D.R. (1983) *Carbon / Nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory*. Oikos. 40: 357-368.
- CHAPIN III, F.S. (1980). *The mineral nutrition of wild plants*. Annual Review of Ecology and Systematic. 11: 233-260.
- CHAVES, F.C.M. (2002). *Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (Ocimum gratissimum L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte*. Tese (Doutorado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. SP.
- FURLANI, A.M.C. (2004). *Nutrição Mineral*. In: *Fisiologia Vegetal*. KERBAUY, G.B. (organizador) 1a. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan: 56-68.
- HERNS, D.A. & MATTSON, W.J. (1992) *The Dilemma of Plants: To grow or Defend*. The quarterly Review of Biology. 67(3):283-317
- HUNT, R. (1982). *Plant growth curves: The functional approach to plant growth analysis*. London. Edward Arnold Publishers: 16-46.

- LEAL, F.P. (2001). *Desenvolvimento, produção e composição de óleo essencial da Mentha piperita L., cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de nitrogênio*. Dissertação (Mestrado em Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. SP
- LIMA, H. R.P., KAPLAN, M.A.C. & CRUZ, A.V.M. (2003). *Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas*. Floresta e ambiente. 10(2): 71-77.
- LEÓN, J., ROJO, E. & SÁNCHEZ-SERRANO, J. (2001). Wound signaling in plants. Journal of Experimental Botany. 52 (354): 1-9.
- LICHTENTHALER, H.K. (1999). *The 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants*. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50: 47-65.
- MOLE, S. & WATERMAN, P.G. (1988). *Light-induced variation in phenolic levels in foliage of Rain-Forests plants. II. Potential significance to herbivores*. Journal of Chemical Ecology. 14: 23-34.
- MAFFEIS, A.R., SILVEIRA, R.L.V.A. & BRITO, J.O. (2000). *Reflexos das deficiências de macronutrientes e Boro no crescimento de plantas, produção e qualidade de óleo essencial em Eucalyptus citriodora*. Scientia Forestalis, 57: 87-98.
- O'NEILL, M.A., EBERHARD, S., ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. (2001). *Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth*. Science. 294 (5543): 846-9.
- PICCAGLIA, R., DELLACECCA, V., MAROTTI, M. & GIOVANELLI, E. (1993). *Agronomic factors affecting the yields and the essential oil composition of peppermint (Mentha piperita L.)*. Acta Horticulturae. 344: 29-40.

- RODRIGUES, C. R., FAQUIN, V. & TREVISAN, D. (2004). *Mineral nutrition, growth and essential oil content of mint in nutrient solution under different phosphorus concentrations*. Horticultura Brasileira. 22(3): 573-578.
- ROSOLEM, C.A. & BASTOS, G.B. (1997) *Deficiências minerais no cultivar de algodão*. Bragantia: 56: 377-387.
- SARRUGE, J. R. (1975). *Soluções nutritivas*. Summa Phytopathologica. 1(3): 231-233.
- SCHACHTMAN, D.P., REID, R.J. & AYLING, S.M. (1998). *Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell*. Plant Physiology. 116 (2): 447-453.
- SILVA, J.R.A. da. & FALCÃO, N.P.S. (2002). *Caracterização de Sintomas de Carências Nutricionais em Mudas de Pupunheira Cultivadas em Solução Nutritiva*. Acta Amazônica. 32, (4): 529-539
- SUELTER, C.H. (1970). *Enzymes activated by monovalent cations*. Science. 168 (3933): 789-795.
- UTUMI, M.M. MONNERAT, P.H., PEREIRA, P.R.G. & FONTES, GODINHO, V.P.C. (1999). *Deficiência de macronutrientes em estêvia: sintomas visuais e efeitos no crescimento, composição química e produção de esteviosídeo*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 34 (6): 1039-1043.
- VALMORBIDA, J. (2003). *Níveis de potássio em solução nutritiva, desenvolvimento de plantas e a produção de óleo essencial de Mentha piperita L.* Dissertação (Mestrado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. SP.
- VIEGAS, I. de J. M., THOMAZ, M.A.A., SILVA, J.F. *et al.* (2004). *Effect of omission of macronutrient and boron on growth, on symptoms of nutritional deficiency and mineral composition in camucamuzeiro*

plants (Myrciaria dubia). Revista Brasileira de Fruticultura. 26 (2): 315-319.

CAPITULO 2

**Ação do ácido jasmônico sobre o rendimento, a
composição química do óleo essencial de
Cordia verbenacea.**

1. INTRODUÇÃO

O ácido jasmônico (AJ) e seu éster metílico (MeJA) ocorrem naturalmente em plantas superiores e tem suas funções relacionadas a muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, tais como a indução da senescência, abscisão foliar e inibição da germinação, respostas a estímulos externos e regulação da expressão gênica (CREELMAN & MULLET, 1995).

São moléculas sinalizadoras e reguladoras derivadas do ácido linoléico.

Em adição ao papel do AJ/MeJA no crescimento e desenvolvimento da planta, é proposta uma ação na regulação da resposta à infecção por patógenos ou ataque por insetos (CREELMAN & MULLET, 1997).

A defesa contra herbivoria presente em plantas envolve a defesa mecânica pré-formada e a resistência induzida (LEÓN *et al.*, 2001). A defesa mecânica pré-formada é composta por barreiras físicas como a presença de tricomas ou espinhos e por substâncias químicas depositadas como lignina e celulose, que conferem um enrijecimento ao tecido e dificultam o acesso do inseto às partes mais nutritivas da planta. A defesa química induzida envolve a ativação de genes por agentes elicitores, com mudanças metabólicas e na expressão de genes (LEÓN *et al.*, 2001).

Observa-se o acúmulo de jasmonatos em plantas feridas ou infectadas por patógenos. Sua presença é requerida para induzir a expressão de genes que codificam inibidores de proteases (XU *et al.*,

1994), enzimas que atuam na biossíntese de flavonóides, sesquiterpenos (CHOI *et al.*, 1994) e proteínas antifúngicas como a tionina (ANDRESEN *et al.*, 1992). O AJ modula a expressão de genes que controlam a resposta ao estresse abiótico e biótico.

Os óleos essenciais de plantas têm sua ação vinculada a relações ecológicas incluindo a comunicação com insetos e defesa contra herbivoria. Sendo esta uma de suas funções na planta, espera-se que sua biossíntese seja amplificada na presença de herbívoros ou que a planta, sob certas condições específicas, aumente os teores de óleo essencial. O AJ pode atuar como sinalizador, induzindo a biossíntese de OE, pois há registro da literatura de sua ação elicitora na biossíntese e emissão de mono, sesquiterpenos e outros compostos voláteis (FILELLA, 2006; HEIL, 2004; KOCH *et al.*, 1999; SCHMELZ *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Observar a possível ação do AJ como agente elicitor da produção de OE de *Cordia verbenacea*;
- ✓ Avaliar o tempo de resposta à aplicação do AJ;
- ✓ Discutir os efeitos do AJ na variação dos principais compostos dos óleos essenciais em cada tratamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

A produção de mudas para este experimento foi similar à descrita no capítulo anterior.

3.2. Experimento

3.2.1. Aplicação de AJ em folhas de *C. verbenacea*

As plantas foram mantidas em casa de vegetação de março a julho de 2006.

As mudas tiveram suas raízes lavadas e foram transferidas para vasos de 3L contendo areia como substrato. Durante setenta dias as plantas foram mantidas em casa de vegetação com aplicação semanal de 200mL de solução nutritiva em cada vaso (SARRUGE, 1975). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 plantas em cada tratamento e 3 repetições.

Para o preparo da solução a ser aplicada em plantas, 125mg de AJ foram dissolvidos em 1mL de acetona PA (Merck ®). O volume foi completado com água até 800mL. Para uma total homogeneização, a solução foi submetida à aplicação de ultra-som. A concentração final da solução pulverizada nas plantas foi de $C=0,1562\text{g/L}$.

A aplicação de AJ foi realizada com pulverizador de vidro

acoplado a uma bomba de vácuo. Plantas controle receberam pulverização de água destilada contendo acetona na mesma concentração que a utilizada nos tratamentos com AJ. A pulverização foi realizada em ambas as faces da folha, cada planta recebeu 40mL de solução (6,25mg de AJ).

3.2.2. Coleta

Antes da aplicação do tratamento, 6 plantas foram coletadas, suas folhas foram trituradas com nitrogênio líquido e congeladas para posterior extração do OE e verificação das condições iniciais de produção de OE. As plantas foram coletadas 2h, 24h e 48h após a aplicação do AJ. Em cada horário foram coletadas as plantas pulverizadas com AJ e as plantas controle, pulverizadas apenas com água destilada e acetona.

Cerca de 50g de folhas de cada tratamento foram trituradas com nitrogênio líquido e congeladas para posterior extração do OE.

3.3 Extração de óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada em sistema de hidrodestilação com aparelho do tipo Clevenger. O sistema de destilação foi refrigerado com um sistema de circulação contendo água/etanol/etilenoglicol na proporção de 2:2:1.

50g de folhas, previamente trituradas com nitrogênio líquido, foram acondicionadas, juntamente com 400mL de água destilada, em balão de fundo redondo de 1L. Utilizou-se em manta de aquecimento Fisatom.

Após 2 horas de destilação, a manta de aquecimento foi desligada, o sistema foi lavado com cerca de 30mL de diclorometano (CH_2Cl_2) e a mistura água/óleo essencial contida no sistema coletor foi recolhida e transferida para funil de separação de 500mL. Após agitação no funil de separação, a fase orgânica foi separada e a fase aquosa restante foi re-extraída por 3 vezes com a adição de 50mL de diclorometano em cada vez. A fase orgânica total resultante foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotativo a 45rpm sob temperatura ambiente. A massa de óleo obtida foi avaliada e seu rendimento calculado em porcentagem em relação à massa inicial de folhas.

O óleo foi diluído em acetona e transferido para balão volumétrico de 10mL. Foi adicionado a cada balão 1mL de solução de dibutilftalato ($C=2\text{mg/mL}$), substância utilizada como padrão interno para a quantificação de α -humuleno.

3.4 Análise cromatográfica do óleo essencial e determinação de Índice de Kovats dos compostos majoritários.

Foi utilizado um cromatográfico a gas Hewlett-Packard modelo HP-6890 equipado com detector seletivo de massas HP-5975, coluna capilar HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Temperaturas:

injetor=220°C, detector=250°C, coluna=60°C com aumento de 3°C/min até 240°C. Gás de arraste Hélio com vazão de 1,0 ml/min.

Para determinar o Índice de Kovats (IK) dos componentes do OE, uma mistura de alcanos (C9-C20) foi injetada no cromatógrafo a gás e analisada sobre as mesmas condições que os óleos essenciais. O IK foi calculado para cada composto. A identificação dos compostos foi feita pela comparação dos padrões de fragmentação fornecidos pelo espectrômetro de massas com os espectros existentes no banco de dados do equipamento (biblioteca virtual NIST 05) e com a literatura (ADAMS, 1995).

Para a quantificação de α -humuleno, as amostras foram injetadas no módulo SIM do cromatógrafo a gás. Foi preparada uma curva analítica com o padrão de α -humuleno com sete pontos, com concentrações variando entre 2 μ m/mL e 80 μ m/mL. Para o α -humuleno foram monitorados os íons 93 (íon de quantificação), 60, 121 e 204 (íons de identificação). Para o padrão de dibutilftalato (DBF), foram monitorados os íons 49 (íon de quantificação), 104, 150 e 223 (íons de identificação).

3.5 Análise estatística dos dados.

Para a análise estatística os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando os testes F, no programa SAS, e posteriormente, ao para comparações múltiplas de Tukey utilizando-se o nível de 5% de significância.

As pressuposições de independência, homogeneidade da

variância e normalidade dos resíduos foram verificadas, validando as análises feitas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 13 são apresentados os resultados para rendimento de OEs e percentual de α -humuleno obtidos nos grupos controle e tratamento com AJ em diferentes tempos de coleta.

Tabela 13. Rendimento de óleos essenciais (OE) e porcentagem de α -humuleno em *C. verbenaea* em função do tempo após o tratamento com AJ.

Tratamento	Rendimento OE(%)	α -humuleno(%)
Controle 0	0,22 c	0,22 a
Tratamento 2h	0,46 a	0,39 a
Controle 2h	0,19 c	0,12 a
Tratamento 24h	0,32 b	0,21 a
Controle 24h	0,26 bc	0,32 a
Tratamento 48h	0,34 b	0,30 a
Controle 48h	0,19 c	0,45 a

*Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si (segundo teste Tukey, com nível de significância 5%).

Foi verificado um aumento significativo na produção de OE após 2h de aplicação da solução com AJ. Nos tratamentos coletados após 24h e 48h, esta resposta foi menos expressiva. Após 24h da administração do tratamento, as plantas controle apresentaram um significativo aumento na produção de OE, o que pode ser relacionado a uma possível resposta ocasionada pela indução por compostos emitidos pelas plantas submetidas ao tratamento com AJ. Na figura 8 é possível acompanhar a variação na produção de OE.

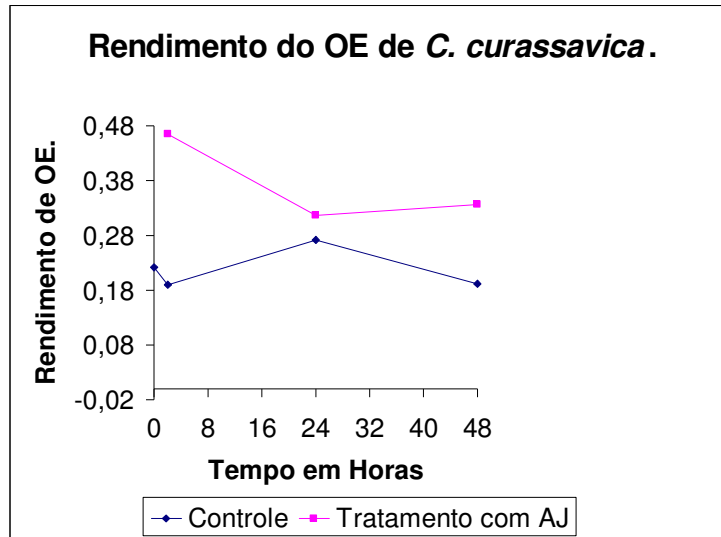


Figura 8. Rendimento de OE em *C. verbenacea*: Controle e tratamento após 2, 24 e 48h. Observar o aumento no rendimento de OE verificado no tratamento controle depois de 24h.

Nas Figuras 9 e 10 estão representados os cromatogramas de duas amostras dos OEs obtidos após duas horas da aplicação do tratamento com AJ e do tratamento controle.

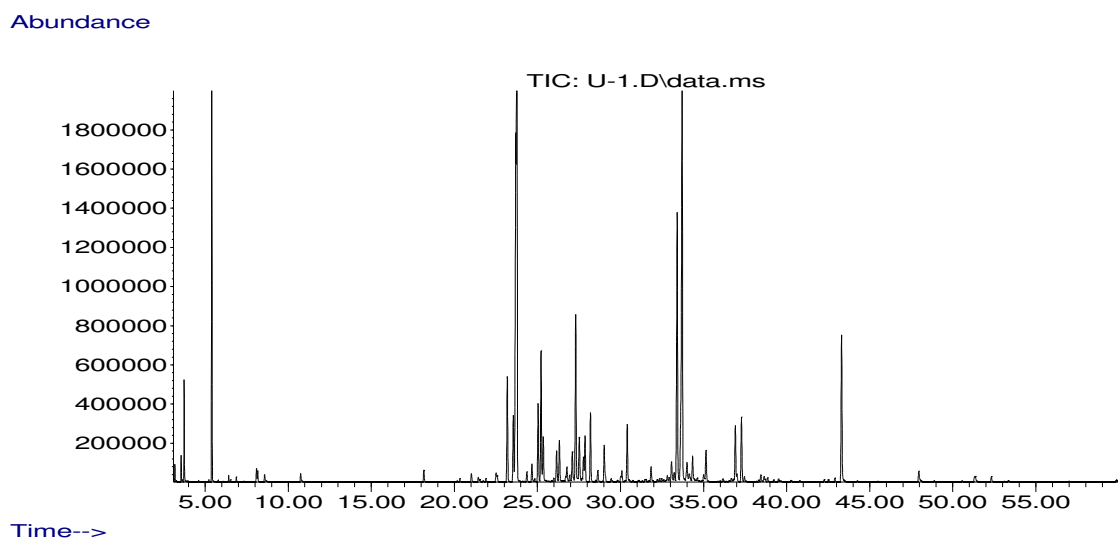


Figura 9. Cromatograma do OE das folhas de *C.verbenacea* do tratamento com AJ (coleta após 2 horas).

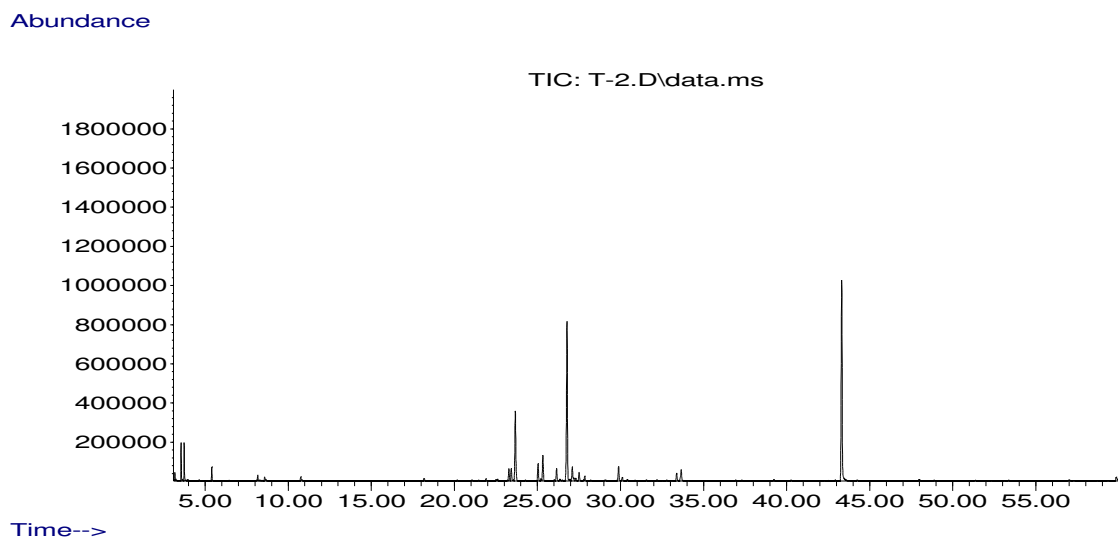


Figura 10. Cromatograma do OE das folhas de *C. verbenacea* do tratamento controle (coleta após 2 horas).

A aplicação de AJ ocasionou um considerável aumento na produção de compostos, embora presentes em pequenas quantidades (Figura10). A porcentagem relativa dos compostos mais abundantes no OE não foi alterada, com exceção do trans-cariofileno, contudo, como não foi realizada a quantificação deste composto, esses índices não são absolutos e conclusivos.

Nos tratamento com AJ observou-se a presença de diferentes compostos mono e sesquiterpênicos ausentes nos grupos controle (Figura 11). Embora não haja nenhum relato na literatura avaliando a ação de elicitores sobre metabólitos secundários presentes em *C. verbenacea*, trabalhos avaliando outras espécies vegetais registraram o aumento da síntese ou emissão de mono e sesquiterpenos. Em *Phaseolus lunatus*, a aplicação de AJ induziu a emissão de compostos voláteis (HEIL, 2004). Também nessa espécie foi avaliado o efeito do AJ, do ácido linoléico e de intermediários desta via, na biossíntese de compostos voláteis. A indução feita por substâncias do início da via (como o ácido linoléico) apresenta um padrão de compostos voláteis diferente daquele induzido por compostos do final da via. Compostos do início da via levam a síntese de diterpenos, já compostos do final da via, como o AJ, levam à síntese de mono e sesquiterpenos, mas não a de diterpenos (KOCH *et al.*, 1999).

Esta indução da biossíntese de mono e sesquiterpenos esta relacionada à ação de Enzimas Terpeno Sintase (TPS), que catalisam a formação do esqueleto terpênico básico a partir de intermediários fosforilados. As enzimas mono e sesquiterpeno sintase apresentaram

aumento de sua atividade em plantas ou culturas de tecidos tratadas com AJ e MeJA (MARTIN *et al.*, 2003).

Na Tabela 14 são apresentados os principais compostos detectados no OE da planta.

Tabela 14. Tempo de retenção (t_R), Índice de Kovats (IK) e percentuais relativos médios (3 repetições) dos compostos mais abundantes presentes no OE de *C. verbenacea*. Tratamento com AJ e controles.

Compostos	t _R min	IK	C0*	T2h*	C2h	T24h	C24h	T48h	C48h
α-pineno	5.404	932	3,28	11,37	1,75	6,96	4,91	3,6	3,015
Sesquiterpeno (M204)	23,18	1404	1,78	2,18	-	1,88	-	1,16	1,75
□-cis-bergamoteno	23,54	1410	1,90	2,71	0,23	4,23	-	-	-
t-Cariofileno	23,69	1418	25,3	35,29	9,42	27,81	22,39	23,85	18,87
Santaleno	23,77	1419	6,8	6,5	-	20,48	8,88	11,02	9,23
□-humuleno	25.04	1452	3,7	2,63	1,333	1,59	2,10	1,74	1,35
Sesquiterpeno (M204)	25,22	1455	-	2,98	-	-	-	6,47	6,34
Alloaromadendreno	25,34	1458	-	2,71	1,33	6,07	2,38	2,43	-
Germacreno-D	26,15	1478	1,28	1,30	1,40	2,40	-	2,01	3,12
Sesquiterpeno (M204)	26,33	1483	1,7	1,04	-	5,66	-	-	-
□-bisaboleno	27.29	1507	2,77	3,70	-	2,31	3,18	5,05	1,95
cubebol	27.51	1513	2,31	2,08	1,19	1,48	1,43	2,33	1,60
δ-Cadineno	27,85	1519	2,02	1,58	0,83	7,59	1,85	3,50	1,78
□-bisaboleno	28,19	1530	-	1,52	-	-	-	-	-
Germacreno B	29,03	1553	-	1,06	-	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	30,41	1588	-	1,42	-	-	-	-	-
Sesquiterpeno (M218)	33,41	1658	3,90	7,28	2,71	3,95	3,85	5,05	3,61
Sesquiterpeno (M218)	33,72	1675	6,63	11,26	1,75	4,95	6,72	7,43	5,63
Sesquiterpeno (M218)	35,15	1717	1,03	0,77	-	-	-	-	-
Sesquiterpeno (M220)	36,90	1767	1,71	1,40	-	-	-	-	-
Sesquiterpeno (M222)	37,28	1778	-	1,52	-	-	-	-	-

*C= plantas dos grupos controle. T=plantas do tratamento com AJ coletadas no tempo zero ou após duas, 24 e 48 horas da aplicação do tratamento.

Os desvios metabólicos observados nas amostras provenientes do tratamento com AJ mostraram variações com padrões similares aos tratamentos nutricionais (Capítulo 1).

Após 24h da aplicação de AJ houve uma menor expressão dos compostos com t_R 33,41 e 33,72 min, e maior produção do composto com t_R 27,85 min, identificado como δ -cadineno (Tabela 13).

Após 48h da aplicação, o percentual relativo médio para δ -cadineno decaiu (3,5). Os Controles não apresentaram tal variação.

A aplicação de AJ atuou sobre o metabolismo secundário da planta e induziu a produção de OE, influenciando a síntese de variados compostos. Contudo, como os valores aqui apresentados se referem aos percentuais relativos dos compostos, pode haver variação de acordo com a metodologia de análise dos dados cromatográficos e com a concentração de DBF acrescentado às amostras para a quantificação de α -humuleno. A grande volatilidade de alguns compostos presentes nos OE's também podem influenciar na variação de sua composição química, prejudicando a precisão dos dados de percentual relativo, embora todo processo de extração dos OE's tenha sido padronizado.

5. CONCLUSÕES

- ✓ O ácido jasmônico pulverizado em folhas de *C. verbenacea*, aumentou a produção de OE após 2h, 24h e 48h da aplicação. Um aumento mais proeminente foi observado após 2h da aplicação.
- ✓ As análises cromatográficas do OE de plantas tratadas com AJ apresentaram um padrão diferente dos controles, demonstrando a indução da síntese de mono e sesquiterpenos.
- ✓ O AJ não alterou os teores de α -humuleno presentes no OE. Mas os percentuais relativos do trans-cariofileno, outro possível princípio ativo da planta, apresentaram aumento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ADAMS, R.P. (1995). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Illinois. Carol Stream.
- ANDRESEN, I., BECKER, W., SCHLÜTER, K., BURGESS, J., PARTHIER, B. & APEL, K. (1992). *The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (Hordeum vulgare)*. Plant Molecular Biology. 19(2):193–204.
- CREELMAN, R.A. & MULLET, J.E. (1995). *Jasmonic Acid Distribution and Action in Plants: Regulation During Development and Response to Biotic and Abiotic Stress*. Proceedings of the National Academy of Science. 92(10): 4114–4119.
- CHOI, D., BOSTOCK, R.M., AVDIUSHKO, S. & HILDEBRAND, D.F. (1994). *Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in Solanum tuberosum L.* Proceedings of the National Academy of Science. 91(6):2329–2333.
- FILELLA, I. PEÑUELAS & J, LLUSIÀ J. (2006). *Dynamics of the enhanced emissions of monoterpenes and methyl salicylate, and decreased uptake of formaldehyde, by Quercus ilex leaves after application of jasmonic acid*. New Phytol. 169(1): 135-44.
- HEIL, M. (2004). *Induction of two indirect defences benefits Lima bean (Phaseolus lunatus, Fabaceae) in nature*. Journal of Ecology. 92(3):527-536.
- KOCH T, KRUMM T, JUNG V, ENGELBERTH J, BOLAND W. (1999). *Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway*.

- Plant Physiology. 121(1): 153-62.
- LEÓN, J., ROJO, E. & SÁNCHEZ-SERRANO, J. (2001). Wound signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*. 52 (354): 1-9.
- MARTIN, D.M. GERSHENZON, J & BOHLMANN, J. (2003). *Induction of Volatile Terpene Biosynthesis and Diurnal Emission by Methyl Jasmonate in Foliage of Norway Spruce*. *Plant Physiology*. 132:1586-1599
- SARRUGE, J. R. (1975). *Soluções nutritivas*. *Summa Phytopathologica*. 1(3): 231-233.
- SCHMELZ, E.A., ALBORN, H.T. & TUMLINSON, J.H. (2001). *The influence of intact-plant and excised-leaf bioassay designs on volicitin- and jasmonic acid-induced sesquiterpene volatile release in Zea mays*. *Planta*. 214 (2): 171-179.
- XU, Y., CHANG, P., LIU, D. NARASIMHAN, M.L., RAGHOTHAMA, K.G., HASEGAWA, P.M. & BRESSAN, R.A.. (1994). *Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate*. *Plant Cell*. 6(8):1077–1085.