



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Respostas morfofisiológicas e bioquímicas de *Lippia gracilis* (Verbenaceae)
frente ao déficit hídrico**

RECIFE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

LUIZ PALHARES NETO

DISSERTAÇÃO

**Respostas morfofisiológicas e bioquímicas de *Lippia gracilis* (Verbenaceae)
frente ao déficit hídrico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências, para obtenção do título de mestre.

RECIFE

2018

LUIZ PALHARES NETO

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE *Lippia gracilis*
(VERBENACEAE) FRENTE AO DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação defendida e aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora:

Profa. Dra. Cláudia Ulisses (Orientadora)

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Marciel Teixeira de Oliveira (Titular)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profa. Dra. Lilia Gomes Willadino (Titular)

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profa. Dra. Ana Virgínia de Lima Leite (Suplente)

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profa. Dra. Flávia Carolina Lins da Silva (Suplente)

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

À minha mãe (Ângela), por estar sempre ao meu lado
e me impulsionar a voar mais alto.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por continuar sendo palco dos melhores momentos da minha vida.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa, que foi tão importante para o desenvolvimento e conclusão do mestrado.

À minha querida e amada “ori-amiga” Cláudia Ulisses, por ser tudo o que eu mais admiro profissionalmente e pessoalmente. Obrigado por me orientar nos mais diversos temas da vida, e por me mostrar que a bondade, humildade e honestidade são cruciais não só para o sucesso na vida, mas também para viver em paz. Obrigado pela oportunidade e por enxergar potencial em mim. Sou muito grato pelos nossos caminhos terem se cruzado.

À Professora Lilia, por ser um exemplo de profissional e pessoa na minha vida. Agradeço por aceitar estar presente no encerramento dessa etapa tão importante pra mim.

À Professora Terezinha, pela oportunidade do ingresso no mestrado, pela orientação e por ser um exemplo de professora. Carregarei sempre comigo os seus ensinamentos.

À Professora Cynthia, por me acompanhar mesmo de “longe”. Obrigado pela paciência, doçura e por compartilhar as *Lippias* comigo.

Ao Professor Marciel, pela disponibilidade, gentileza e excelentes sugestões que impulsionaram esse trabalho.

À Professora Ana Virginia, por me acompanhar desde a graduação, estando presente de forma direta e indireta em todas as etapas importantes da minha vida acadêmica.

À Professora e amiga Flávia, por toda a ajuda e companheirismo. Obrigado por estar sempre ao meu lado me apoiando e me fazendo feliz. Você é muito especial na minha vida.

À minha melhor amiga acadêmica, Linda, por todos os momentos que passamos juntos, por todos os ensinamentos e risadas. Obrigado por trazer leveza para a minha trajetória acadêmica e para minha vida. Obrigado por ser o melhor presente que a “Ciência” me trouxe.

À família LCTV, que compreende os membros atuais (Bruna, Barbara, Pamela, Gabriela, Igor, Nany e Léo) e os que já partiram para iluminar outros ambientes (Rodolfo,

Carlinha, Lili, Martinha, Lalá, Marina, Gemima, Alana e Felipe). Agradeço pelos momentos de leveza e, acima de tudo, pela ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao meu amigo peruano Rafael, por ter me ensinado que a coragem é uma virtude primordial para o sucesso pessoal e profissional. Obrigado por ser um exemplo pra mim.

Aos meus amigos da graduação que se tornaram amigos da vida (Marcela, Raphael, Poliana e Ana), obrigado por me apoiarem e me impulsionarem a crescer.

À Jordy, por ser a pessoa que mais me apoiou durante todo o percurso, mesmo quando eu mesmo não acreditava em mim. Obrigado por fazer minha vida feliz.

À Lidi e Nati Ferreira, minhas melhores amigas da vida. Obrigado por serem a família que eu escolhi, as pessoas a que eu peço socorro e colo. Obrigado por compartilharem suas vidas comigo.

À Nati Corte Real, por me ajudar e estar presente em diversos momentos da minha vida pessoal e acadêmica. Obrigado por ser tão companheira e amiga, sempre.

À Marci, por ser essa pessoa iluminada que, por sorte, escolheu ser minha amiga. Obrigado por ser exemplo de superação, garra, bondade, humildade, honestidade e ética. Obrigado pelas risadas frouxas e pelo acolhimento frequente, mesmo nos momentos em que era você que estava precisando ser acolhida.

À minha mãe (Angela) e ao meu irmão (Rafael), por serem responsáveis pelo que sou. Obrigado por me apoiarem e sentirem comigo o misto de emoções de cada etapa da minha vida. Vocês são os grandes motivos disso tudo. Amo vocês, ‘mainha’ e ‘cabeção’.

À minha irmã Ana Karla, por me mostrar que existem laços que dispensam explicações temporais. Obrigado por fazer parte da minha vida, por me presentear com sua família e estar sempre torcendo por mim.

Agradeço a Deus por motivos que não caberiam nessas páginas, porém destaco a quantidade de pessoas boas colocadas no meu caminho. Pessoas já mencionadas acima e outras que me ajudaram direta e indiretamente durante as diversas etapas da minha vida, sendo, portanto, responsáveis por esse trabalho e título.

Finalizo agradecendo “as minhas plantinhas” *Lippias*, responsáveis não só por essa pesquisa, mas por me fazerem um ser humano melhor e mais próximo de Deus. Obrigado por me ensinar que há muito a dizer mesmo em silêncio.

“Lança o barco contra o mar
Venha o vento que houver
E se puder, voa.”

Rubel

RESUMO

No presente estudo, buscou-se investigar as respostas morfofisiológicas e bioquímicas da espécie *Lippia gracilis* Schauer frente à condição de déficit hídrico. Plantas provenientes de estacas foram submetidas a dois regimes hídricos, com e sem suspensão de rega durante 15 dias e posteriormente foram reidratadas por 10 dias. Durante os períodos sob regimes hídricos, foram realizadas análises fisiológicas, biométricas, bioquímicas e anatômicas. A condição de déficit hídrico afetou negativamente o crescimento da parte aérea e da área foliar, com reduções aproximadas de 60% e 50%, respectivamente, enquanto que o crescimento do sistema radicular foi estimulado pelo estresse (aumento de 500%). A condição de seca ocasionou a redução dos parâmetros fisiológicos (condutância estomática - g_s , transpiração - E , fotossíntese líquida - A e teor relativo de água foliar - TRA), enquanto que a temperatura foliar e a razão da concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) aumentaram. Plantas submetidas ao estresse apresentaram maior eficiência intrínseca do uso da água no 10º dia de suspensão (A/g_s). Os teores de clorofila total, carotenoides e carboidratos solúveis, foram aumentados no 10º e 15º dia de suspensão hídrica. Os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), proteínas e malonaldeído (MDA) foram elevados em plantas submetidas ao déficit hídrico no 15º dia de suspensão. Os níveis de H_2O_2 nas plantas controle foram aumentados no 20º e 25º de reidratação, acompanhados da ativação de algumas enzimas do sistema antioxidativo (SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase e APX – ascorbato peroxidase), enquanto que nas plantas sob déficit hídrico a SOD aumentou sua atividade no 10º dia e a CAT no 10º e 15º dia sob estresse. Plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram redução da espessura do mesofilo, menores células epidérmicas, redução dos espaços intercelulares, maior quantidade dos feixes vasculares, maior lignificação das células xilemáticas e modificação morfológica das células corticais. Na reidratação, as plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram recuperação em todas as variáveis analisadas. Diante dos resultados, conclui-se que a rápida recuperação dos parâmetros avaliados na espécie estudada pode estar relacionada com a ausência de danos irreversíveis nas estruturas celulares, devido a eficiência do sistema antioxidativo e de processos metabólicos envolvidos com a dissipação do excesso de energia em decorrência do estresse hídrico imposto. Aliado a isso, outras estratégias morfofisiológicas importantes como o aumento no crescimento radicular, aumento na quantidade dos feixes vasculares e redução da área foliar, proporcionaram maior eficiência na absorção de água do solo e na manutenção do conteúdo hídrico celular em plantas de *Lippia gracilis* submetidas ao déficit hídrico.

Palavras-chaves: Sistema antioxidativo; anatomia foliar; osmorregulação; trocas gasosas; pigmentos; floresta tropical sazonal seca.

ABSTRACT

In the present study, we investigated the morphophysiological and biochemical responses of the species *Lippia gracilis* Schauer to water deficit. Plants from cuttings were submitted to two water regimes, irrigation (control) and suspended irrigation (stress) for 15 days and were then rehydrated for 10 days. During water regimes, we performed physiological, biometric, biochemical, and anatomical analyzes. The water deficit negatively affected growth of the aerial part of the plant and the leaf area, with reductions of approximately 60% and 50%, respectively. On the contrary, root system growth was stimulated by water deficit (increase of 500%). The drought caused a reduction in the physiological parameters (stomatal conductance - g_s , transpiration - E , net photosynthesis - A and relative leaf water content - RWC), while leaf temperature and internal and external CO_2 concentration ratio (C_i/C_a) increased. Plants subjected to drought had higher intrinsic efficiency of water use on the 10th day of deficit (A/g_s). The levels of total chlorophyll, carotenoids, and soluble carbohydrates increased on the 10th and 15th days of water suspension. The levels of hydrogen peroxide (H_2O_2), proteins, and malondialdehyde (MDA) were high in plants on the 15th day of water deficit. The levels of H_2O_2 in the control plants increased on the 20th and 25th day of rehydration, followed by the activation of some enzymes of the antioxidative system (SOD - superoxide dismutase, CAT - catalase and APX - ascorbate peroxidase). Plants under water deficit increased SOD activity on the 10th day and CAT on the 10th and 15th day under stress. Plants submitted to water deficit showed reduction of mesophyll thickness, smaller epidermal cells, reduction of intercellular spaces, more vascular bundles, greater lignification of xylem cells, and morphological modification of cortical cells. During rehydration, the plants submitted to the water deficit recovered in all variables analyzed. We conclude that the rapid recovery of the parameters evaluated for *Lippia gracilis* are related to the absence of irreversible damage in the cellular structures, due to the efficiency of the antioxidative system, and metabolic processes involved with the dissipation of the excess energy because of the imposed water stress. In addition, other important morphophysiological strategies such as increased root growth, increased vascular bundles, and reduced leaf area improved soil water absorption and maintained the cellular water content in *Lippia gracilis* plants submitted to drought.

Key words: Antioxidative system; dry tropical seasonal forest; gas exchange; leaf anatomy; osmoregulation; pigments

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO I

Figura 1. Planta de *Lippia gracilis* Schauer do acervo da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN), localizada no município de Mossoró.26

Figura 2. Desenho esquemático sobre o status redox celular: (A) Células hidratadas apresentam equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e moléculas antioxidativas que as combatem, acarretando em um equilíbrio redox; (B) Células sob déficit hídrico apresentam um desequilíbrio devido a maior produção de ROS, causando um desequilíbrio redox (estresse oxidativo).30

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO II

Figura 1. Déficit de pressão de vapor (DPV) obtido no período do experimento (Fevereiro e Março/2017).....44

Figura 2. Plantas de *Lippia gracilis*: (A e B) irrigadas aos 15 e 25 dias, respectivamente; (C e D) submetidas ao déficit hídrico, no 15º de suspensão da irrigação e na reidratação aos 25 dias, respectivamente. Barra: 10 cm49

Figura 3. A - Condutância estomática (gs); B - Transpiração (E); C - Fotossíntese líquida (A); D - Teor relativo de água na folha (TRA); E – Temperatura (°C) foliar; F - Razão da concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a); G - Eficiência do uso intrínscio da água (A/g) em plantas de *Lippia gracilis* submetidas a dois regimes hídricos: com rega (controle) e suspensão total da irrigação (estresse). Os valores representam a média de três repetições. As letras indicam diferenças entre os tratamentos hídricos nos diferentes tempos avaliados.51

Figura 4. A - A - Teores de carboidratos solúveis totais; B - Clorofila total; C - Carotenoides em plantas de *Lippia gracilis* submetidas a dois regimes hídricos: com rega (controle) e suspensão total da irrigação (estresse). Os valores representam a média de três repetições. As letras indicam diferenças entre os tratamentos hídricos nos diferentes tempos avaliados.....52

Figura 5. A - Teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂); B - Malondealdeído (MDA); C - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD); D - Catalase (CAT); E - Ascorbato peroxidase (APX); F - Teor de proteínas solúveis em plantas de *Lippia gracilis* submetidas a dois regimes hídricos: com rega (controle) e suspensão total da irrigação (estresse). Os valores representam a média de três repetições. As letras indicam diferenças entre os tratamentos hídricos nos diferentes tempos avaliados54

Figura 6. Cortes transversais do mesofilo de folhas de plantas de *Lippia gracilis* submetidas a dois regimes hídricos: (A e B) plantas sempre hidratadas; (C e D) Plantas submetidas ao déficit hídrico aos 15 dias de suspensão de rega; (E e F) plantas submetidas ao déficit hídrico após 10 dias de reidratação. Caracteres anatômicos: (1) espessura do mesofilo; (2) células

epidérmicas na face adaxial; (3) parênquima paliçádico; (4) parênquima lacunoso; (5) espaços extracelulares. Barra: 100 μm (A, C e E) e 50 μm (B, D e F)..... 56

Figura 7. Cortes transversais da nervura central de folhas de plantas de *Lippia gracilis* submetidas a dois regimes hídricos: (A e B) plantas sempre hidratadas; (C e D) Plantas submetidas ao déficit hídrico aos 15 dias de suspensão de rega; (E e F) plantas submetidas ao déficit hídrico após 10 dias de reidratação. Caracteres anatômicos: (1) células parenquimáticas; (2) feixe vascular central; (3) feixes vasculares acessórios; (4) espaços extracelulares; (5) epiderme adaxial. Barra: 100 μm (A, C e E) e 50 μm (B, D e F).....57

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO II

Tabela 1. Taxa de crescimento relativo (TCR) da parte área (P.A.) e da raiz de *Lippia gracilis* no 5º dia (exposição ao déficit hídrico), 15º dia (período máximo de exposição ao déficit hídrico) e 25º dia (reidratação). Os valores representam a média de três repetições. As letras indicam diferenças entre os tratamentos hídricos nos diferentes tempos avaliados48

Tabela 2. Área foliar de *Lippia gracilis* avaliada no dia 0 (zero) (antes da exposição ao déficit hídrico); 15º dia (período máximo de exposição ao déficit hídrico) e 25º dia (período de reidratação). Os valores representam a média de três repetições. As letras indicam diferenças entre os tratamentos hídricos nos diferentes tempos avaliados49

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
CAPITULO I	20
1. Introdução Geral	22
2. Revisão de Literatura	24
2.1 Floresta Tropical Sazonal Seca	24
2.2 <i>Lippia gracilis</i> Schauer	25
2.3 Déficit hídrico	27
3. Referências	31
CAPÍTULO II	39
Respostas fisiológicas e bioquímicas de <i>Lippia gracilis</i> (Verbenaceae) frente ao déficit hídrico	
Resumo	41
Introdução	42
Material e Métodos	43
Resultados	48
Discussão	58
Conclusões	63
Referências	64

CAPITULO I

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1. Introdução Geral

A Floresta Tropical Sazonal Seca (FTSS) brasileira, também conhecida como Caatinga, cobre basicamente o semiárido brasileiro e apresenta uma rica biodiversidade vegetal que contribui para economia do país, principalmente nos ramos farmacêuticos e da construção civil (Santos et al., 2008). A utilização indiscriminada dos recursos vegetais pelas indústrias e comunidades locais, compromete a conservação de espécies únicas, ou seja, que só ocorrem nesse tipo de floresta (Nobre, 2011). Segundo o Ministério do Meio Ambiente, estima-se que 46% da área total da Caatinga foi degradada, evidenciando a importância de estudos voltados para conservação de espécies da fauna e flora desse ecossistema. Aliada a essa problemática, o semiárido brasileiro apresenta características climáticas peculiares, tais como reduzida e variável precipitação, elevadas temperaturas e baixas taxas de umidade, que em conjunto, resultam em um acentuado déficit hídrico (Silva et al., 2015).

A espécie *Lippia gracilis* Schauer pertence à família Verbenaceae e se destaca por apresentar propriedades medicinais devido aos compostos fenólicos presentes em seu óleo essencial armazenado e secretado pelos seus tricomas glandulares (Lima et al. 2013; Melo et al. 2013; Marinho et al., 2011). O óleo essencial extraído de suas folhas apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral (Marreto et al., 2008; Cruz et al., 2013; Ferraz et al., 2013). Essa espécie é endêmica da Caatinga, ocorrendo nos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Sergipe, Piauí (Lorenzi e Matos, 2002), no semiárido do Estado de Pernambuco e em pequena parte do Rio Grande do Norte (Marreto et al., 2008).

A água é um dos recursos de maior importância na vida vegetal, e um dos mais limitantes. As plantas, como organismos sésseis, são impossibilitadas de evadir das ameaças ambientais, portanto, desenvolveram estratégias adaptativas de defesa e enfrentamento aos fatores bióticos e abióticos. Esses mecanismos podem ser de ordem morfológica, fisiológica, anatômica e bioquímica (Zargar et al., 2017; Yi et al., 2016; Barcia et al., 2014; Cavatte et al., 2012). Algumas plantas sob condições de déficit hídrico, podem apresentar o aumento do sistema radicular para ampliar a área de absorção de água do solo, bem como uma diminuição da área foliar para reduzir as taxas transpiratórias (Ajithkumar & Panneerselvam, 2014). Associados a esses fatores, as plantas podem elevar a produção de substâncias conhecidas como osmorreguladoras, que são de extrema importância no processo da manutenção da turgescência celular em situações de deficiência hídrica (Cavatte et al., 2012; Dominghetti et al., 2015). Além disso, a eficiência do sistema antioxidativo enzimático e não enzimático,

frente à elevada produção de espécies reativas de oxigênio decorrente de estresse, é um importante mecanismo bioquímico para manutenção da homeostase redox e sobrevivência da planta (Barbosa et al., 2014).

Diante do exposto, compreender mecanismos morfofisiológicos e bioquímicos adotados por *Lippia gracilis* Schauer frente à irregularidade hídrica, elucidará algumas estratégias de adaptação que permite a sobrevivência em seu habitat natural, oferecendo informações que possam ser utilizadas em programas de melhoramento genético de plantas.

2. Revisão de Literatura

2.1 Floresta Tropical Sazonal Seca Brasileira

A região de Floresta Tropical Sazonal Seca (FTSS) brasileira, também conhecida como Caatinga, ocupa uma área de 844.453 Km², o equivalente a 11% do território nacional, englobando os seguintes Estados: Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o Norte de Minas Gerais (Ministério do Meio Ambiente, 2014). Essa região apresenta uma ampla diversidade quando comparada com outras regiões áridas do mundo, apresentando diversas espécies únicas, ou seja, não ocorrentes em nenhuma outra parte do planeta (Silva et al., 2015). Apesar da sua importância no cenário social e ambiental, pouco mais de 8% dessa floresta estão protegidos por unidades de conservação federal e apenas 1,4% em unidades de conservação de Proteção Integral (Mittermeier & Scarano, 2013).

Os estudos acerca dos impactos das mudanças climáticas sobre a estabilidade dos biomas no Brasil, mostram mudanças significativas na vegetação do semiárido do Nordeste brasileiro. O alto grau de degradação dessas regiões, sinaliza que a Caatinga está entre os ecossistemas mais vulneráveis devido ao cenário de aumento das temperaturas globais e redução da precipitação, o que coloca a região Nordeste do Brasil em alerta, devido ao risco considerado de extinção de espécies da flora e da fauna desse importante bioma (Nobre, 2011).

A biodiversidade vegetal da Floresta Tropical Sazonal Seca brasileira conta com aproximadamente 2.213 espécies de angiospermas distribuídas em 126 famílias, das quais 318 espécies (18 gêneros e 42 famílias) são endêmicas desse ecossistema (Flora do Brasil, 2018; Giulietti et al., 2002). Essa biodiversidade ampara diversas atividades econômicas do país, especialmente nos ramos farmacêutico, cosmético, químico, construção civil e de alimentos. Cerca de 27 milhões de pessoas vivem nessa floresta, a maioria carente de amparo financeiro e dependente dos recursos desse bioma para sobreviver. Apesar da sua importância, a FTSS tem sido desmatada de forma acelerada, principalmente nos últimos anos, chegando a 46% de desmatamento, devido principalmente ao consumo de lenha nativa, explorada de forma ilegal e insustentável, para fins domésticos e indústrias, ao sobrepastoreio e a conversão de áreas para pastagens e agricultura (Ministério do Meio Ambiente, 2014). Estima-se de que 65,57% da vegetação da FTSS apresente propriedades medicinais (Santos et

al., 2008), as quais são utilizadas pelas populações e indústrias de maneira exploratória e não renovável (Silva et al., 2012).

As plantas consideradas medicinais são aquelas que apresentam compostos químicos proveniente do seu metabolismo primário e/ou secundário que desempenha alguma função na profilaxia e/ou cura de doenças. Atualmente, o uso de produtos naturais vem ganhando destaque no tratamento da saúde humana e animal, pois podem apresentar substâncias bioativas contra parasitos, micro-organismos e enfermidades de outra natureza, sem causar prejuízos ao meio ambiente, além de serem menos agressivos à saúde do homem, no que se refere aos resíduos farmacológicos e de agrotóxicos presentes nos alimentos de origem animal e vegetal, respectivamente (Fernandes et al., 2015; Ferraz et al., 2013; Albuquerque et al, 2006).

Considerando o reconhecimento do potencial terapêutico das espécies nativas da FTSS, o interesse crescente da indústria farmacêutica na obtenção de fitoterápicos e a necessidade da realização de pesquisas voltadas a sua conservação, no ano de 2006, o Governo Federal estabeleceu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que busca ressaltar a importância da pesquisa nesta área, como forma de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e os fitoterápicos por elas produzidos, além de promover o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (Ministério da Saúde, 2006).

2.2 *Lippia gracilis* Schauer

A família Verbenaceae compreende aproximadamente 2.614 espécies distribuídas em 98 gêneros no mundo, dos quais 49 gêneros e 476 espécies ocorrem no Brasil (Salimena et al., 2015). Na região nordeste estima-se a ocorrência de 37 espécies, se destacando as do gênero *Lippia*. Esse gênero, cujo nome é uma homenagem ao botânico italiano Lippi, é representado por ervas, arbustos e pequenas árvores que são frequentemente aromáticas, em decorrência da presença de óleos essenciais, e estão distribuídas na América Central e do Sul e territórios da África Central (Cruz, 2013; Lorenzi e Matos, 2002). O gênero *Lippia* apresenta aproximadamente 200 espécies, das quais 108 ocorrem no Brasil, sendo 12 delas ocorrentes na região Nordeste (Salimena et al., 2015).

A *Lippia gracilis* Schauer (Figura 1), pertencente à família Verbenaceae, é conhecida como uma das plantas mais importantes na lista da Central de Medicamentos (CEME) para o Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais (PPPM) do Ministério da Saúde (Ferreira et al., 1998). Recentemente essa espécie foi considerada por O’Leray et al. (2012), juntamente com outras três espécies (*Lippia dumetorum* Herzog, *Lippia hickenii* Tronc. e *Lippia laxibracteata* Herzog), como sinônimo de *Lippia grata*.

Trata-se de uma espécie endêmica do Nordeste brasileiro (Gomes et al., 2011; Giulietti et al., 2002), popularmente conhecida como alecrim da chapada e alecrim de tabuleiro. Apresenta porte subarborescente com altura variando de 1,2 a 3,0 metros, muito ramificado, contendo folhas aromáticas, flores de coloração branca (Matos et al., 2004) e frutos contendo sementes com reduzido índice de germinação, sendo encontrada nos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Sergipe, Piauí (Lorenzi e Matos, 2002), no semiárido do Estado de Pernambuco e em pequena parte do Rio Grande do Norte (Marreto et al., 2008).



Figura 1. Planta de *Lippia gracilis* Schauer do acervo da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN), localizada no município de Mossoró.

As folhas de *L. gracilis* apresentam propriedades químicas e farmacêuticas significativas na atividade antimicrobiana (Fernandes et al., 2015; Albuquerque et al., 2006.), devido aos compostos químicos timol e carvacrol (Moraes et al., 2017; Souza et al., 2017; Trevisan et al., 2016; Bitu et al., 2015; Cruz et al., 2014) presentes no óleo essencial, que são acumulados nos tricomas glandulares (Albuquerque et al., 2006).

O óleo de *L. gracilis* vem sendo usado topicamente em dermatoses, infecções da garganta, resfriados, tratamento da acne (Matos, 1999), como agente larvicida no controle de espécies como *Aedes aegypti* (Silva et al., 2008), causador da dengue e de *Callosobruchus maculatus* (Marreto et al., 2008; Pereira et al., 2007.), inseto que atinge a família Fabaceae especialmente o feijão (*Phaseolus vulgaris*), provocando perdas consideráveis na produção durante o armazenamento. Outra espécie de inseto onde se observou a atividade inseticida do óleo essencial da *Lippia gracilis* foi *Diaphania hyalinata*, inseto responsável pela redução produtiva de espécies alimentícias como melão (*Cucumis melo*) e pepino (*Cucumis sativus*) (Melo et al., 2018). Também foi observada a eficácia no controle *in vitro* de larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (carrapato de boi) (Cruz et al., 2013), bem como atividades moluscida e antioxidante (Lima et al., 2008). A ação anticancerígena do óleo essencial de *L. gracilis* foi observada em ensaios *in vitro* da proliferação e apoptose de células HepG2 (human hepato cellular carcinoma) e em camundongos com células tumorais de Sarcoma 180, evidenciando em ambos ensaios uma atividade antitumoral significativa (Ferraz et al., 2013). Estudos de Ribeiro e colaboradores (2012), também confirmaram a atividade citotóxica do extrato de *L. gracilis*.

Trabalhos realizados por De Souza et al. (2017) e Cruz et al., (2014) demonstraram que plantas de *Lippia gracilis* submetidas ao déficit hídrico apresentaram reduzida variação dos constituintes químicos em comparação com plantas hidratadas, demonstrando rusticidade na composição química dos seus óleos essenciais. Porém são escassos trabalhos voltados na identificação dos mecanismos adaptativos à condição de déficit hídrico da referida espécie.

Diante da importância medicinal da *L. gracilis*, aliada a intensa exploração para fins terapêuticos (Souza et al., 2012), faz-se necessário identificar mecanismos de tolerância a ambiente com baixo índice de precipitação, para elucidar algumas estratégias de adaptação que permite a sobrevivência dessa espécie em seu habitat natural, oferecendo informações que possam ser utilizadas em programas de melhoramento genético de plantas.

2.3 Déficit hídrico

Estresses abióticos desempenham importante papel na determinação da distribuição de diferentes espécies de plantas em distintos tipos de ambientes. Os efeitos resultantes do estresse abiótico em ambientes naturais e agrícolas estão ganhando atenção cada vez mais, devido aos impactos resultantes das mudanças climáticas sobre os padrões de precipitação e temperaturas extremas. Regiões áridas e semiáridas do mundo, como o Nordeste brasileiro, enfrentam problemas com precipitações irregulares (Oliveira et al., 2011). Como estratégias para mecanismo de defesa a estresses, as plantas percebem as tensões do ambiente e regulam seu metabolismo por meio de processos biológicos, para lidar com esses estresses (Campelo et al., 2015). Esses mecanismos incluem respostas morfológicas, fisiológicas, anatômicas e bioquímicas.

A regulação do crescimento no ápice radicular por meio de um sistema sensorial também desempenha um importante papel na resposta adaptativa ao estresse hídrico. O alongamento de raízes secundárias, bem como de pelos radiculares, tem sido descrito como uma resposta adaptativa das plantas em condições de baixo potencial hídrico. Em condições de estresse hídrico moderado é possível verificar o aumento no crescimento da raiz ao contrário da parte aérea, a qual pode apresentar redução significativa do seu crescimento em decorrência da redução na disponibilidade de água (Silva et al., 2017; Aidar et al., 2015; Pezzopane et al., 2015; Ajithkumar & Panneerselvam, 2014).

As folhas também podem apresentar algumas mudanças morfológicas frente ao déficit hídrico, como a redução da área foliar e maior produção de cera cuticular, visando a diminuição da perda de água (Silveira et al., 2016). Além disso, a senescência e abscisão foliar, ocasionado pela influência do ácido abscísico (ABA), é um mecanismo adotado por algumas espécies para sobreviver em períodos mais secos, cuja a disponibilidade de água do solo é baixa, ocasionando uma redução no metabolismo da planta (Planchet et al., 2014).

No que diz respeito aos pigmentos fotossintéticos, a capacidade de manter níveis adequados de clorofila, provavelmente está relacionada à tolerância e eficiência fotossintética de plantas em condições ambientais adversas, onde essas respostas podem estar atreladas à atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de clorofila, ou estratégias que reduzem a degradação desses pigmentos, evitando assim, a redução dos níveis de clorofila em condições de estresse (Ashraf e Harris, 2013). Enquanto que os carotenoides, conhecidos como pigmentos acessórios, são importantes na proteção dos aparelhos fotossintéticos contra os

danos oxidativos causados pelo estresse (Wahid, 2007), sendo suas maiores concentrações, em condições de déficit hídrico, um indicador de genótipos tolerantes (Silva et al., 2014).

A taxa fotossintética é reduzida nos períodos secos, devido, dentre os outros fatores, a redução da absorção de CO₂, ocasionado pelo fechamento estomático, e por danos causados nos fotossistemas (Silva et al., 2017; Yi et al., 2016). Plantas consideradas tolerantes apresentam rápida recuperação quando o agente estressor é suprimido (Gorai et al., 2015).

Outro processo metabólico que pode ser influenciado pelo déficit hídrico é a fotorrespiração. A atividade fotorrespiratória envolve a atividade de três organelas: cloroplasto, peroxissomos e mitocôndrias. Esse processo se dá pela atividade da oxigenase da Ribulose - 1,5-bifosfato (Rubisco), no cloroplasto, produzindo 2-fosfoglicolato que é direcionado aos peroxissomos para o início do processo de recuperação do carbono perdido pela atividade oxigenase. Na mitocôndria ocorre a liberação de CO₂ como produto da conversão de duas moléculas de glicina em uma de serina, essa por sua vez, fará o caminho inverso para regenerar o 3-fosfoglicerato que será direcionado ao Ciclo de Calvin no cloroplasto (Talbi et al., 2015; Zhang et al., 2016). Durante esse processo ocorre a oxidação de equivalentes redutores que podem atenuar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em condições de estresse abiótico (Lima Neto et al., 2017; Eisenhut et al., 2017). Além disso, nos peroxissomos ocorre a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que em baixas concentrações atuam como moléculas sinalizadoras (Barbosa et al., 2014; Talbi et al., 2015).

A suspensão no crescimento de plantas submetidas a déficit hídrico está correlacionado à perda da turgescência celular (Dominghetti et al., 2016; Cerqueira et al., 2015; Afzal et al., 2014), sendo o ajuste osmótico de extrema importância para minimizar esse fato, através da maior produção e acúmulo de agentes osmorreguladores (Chen & Murata, 2008; Szabados & Saviouré, 2010). Os agentes osmorreguladores podem ser de ordem inorgânica, se destacando íons de potássio (K⁺) e cloreto (Cl⁻), e/ou orgânica como carboidratos, sendo a sacarose a mais abundante, proveniente da biossíntese ou quebra do amido (Santelia e Lawson, 2016). O alto teor desses compostos diminuem o potencial hídrico das folhas, acarretando uma maior absorção de água, atenuando os efeitos do estresse hídrico (Cavatte et al., 2012).

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre naturalmente durante os processos metabólicos vitais para sobrevivência da planta, sendo suas concentrações controladas por moléculas antioxidantes, enzimáticas e não-enzimáticas (Karuppanapandian

et al., 2012). Em baixas concentrações, as ROS atuam como sinalizadores celulares, porém, sob condições ambientais desfavoráveis, pode ocorrer um desequilíbrio na produção e remoção dessas moléculas, desencadeando um tipo de estresse secundário, denominado estresse oxidativo (Figura 2) (Barbosa et al., 2014). O alto teor de ROS pode causar danos nas estruturas celulares e ocasionar a morte da planta (Gill e Tuteja, 2010). Um importante mecanismo adotado pelas plantas ocorrentes em ambientes áridos é a eficiência do seu aparato enzimático, que minimizam os efeitos deletérios do acúmulo dessas moléculas.

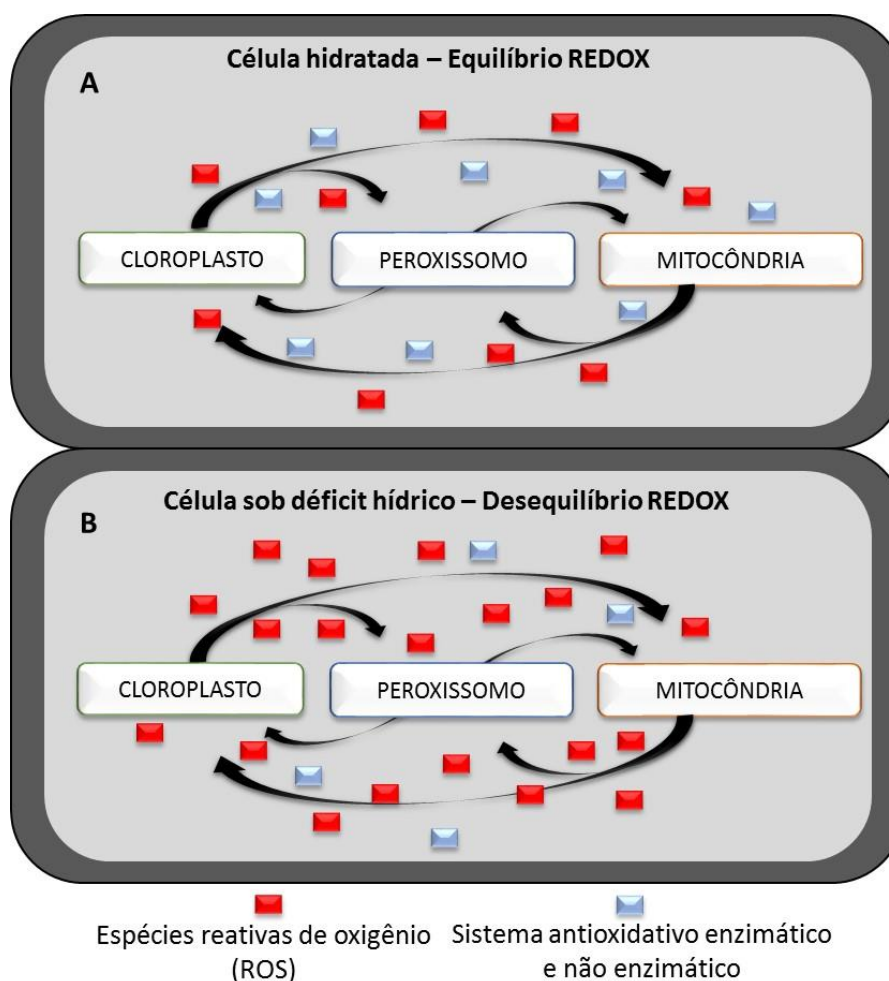


Figura 2. Esquema do status redox celular: (A) Células hidratadas apresentam equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e moléculas antioxidativas que as combatem, acarretando em um equilíbrio redox; (B) Células sob déficit hídrico apresentam um desequilíbrio devido a maior produção de ROS, causando um desequilíbrio redox (estresse oxidativo).

As estratégias para assegurar sistemas de conservação e manejo sustentável de espécies do semiárido, exigem o conhecimento de mecanismos morfofisiológicos e bioquímicos desenvolvidos diante de estresses ambientais, como o déficit hídrico. Essas

informações irão auxiliar no planejamento de manutenção da biodiversidade do bioma (Albuquerque et. al., 2012).

3. Referências

- AFZAL, A.; GULZAR, I.; SHAHBAZ, M.; ASHRAF, M. Water deficit-induced regulation of growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, inorganic nutrient accumulation and antioxidative defense mechanism in mungbean [*Vigna radiata* (L.)Wilczek]. **Journal of Applied Botany and Food Quality**. V. 87, p. 147 – 156. 2014.
- AIDAR S. T. et al. Características fisiológicas, produção total de raízes e de parte aérea em acessos de *Manihot esculenta* em condições de déficit hídrico. **Revista Brasileira de Geografia Física**. V.8, n. 4. P. 685-696, 2015.
- AJITHKUMAR, I.P.; PANNEERSELVAM, R. ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* roth. under drought stress. **Cell Biochem. Biophys**. V. 68, p. 587–595. 2014.
- ALBUQUERQUE, C.C. et al. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.4, p.527-35, 2006.
- ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; SANT'ANA, A.E.G.; ULISSES, C.; WILLADINO, L.; MARCELINO JÚNIOR, C. Effects of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer on caulinary shoots of heliconia cultivated *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n.1, p.26-33, 2012.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**. V.51, N.2, pp.163-190, 2013.
- BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, mar, 2014.
- BARCIA, R.A.; PENA, L. B.; ZAWOZNIK, M. S.; BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; Osmotic adjustment and maintenance of the redox balance in root tissue may be key points to overcome a mild water deficit during the early growth of wheat. **Plant Growth Regul.** V. 74, P.:107–117. 2014.
- BITU, V. C. N. et al. Effect of Collection Time on Composition of Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) Growing in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil-bearing Plants Jeop.** p. 1-8. 2015.

CAMPELO, D. H.; LACERDA, C. F.; SOUZA, J. A.; CORREIA, D.; BEZERRA, M. E.; ARAÚJO, J. M.; NEVES, A. L. R. Trocas gasosas e eficiência do fotossistema II em plantas adultas de seis espécies florestais em função do suprimento de água no solo. **Revista Árvore**. v. 39, n.5; p. 973-983. 2015.

CAVATTE, P. C. et al. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee: a morphophysiological analysis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 144, p. 111-122, 2012.

CERQUEIRA, R. C.; COSTA, J. M.; CHAVES, M. M.; RODRIGUES, J. D. Fisiologia e metabolismo foliar em duas variedades de videira sujeitas a um ciclo de déficit hídrico e reidratação. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. V.10, n.2, p.211-217, 2015.

CHEN, T.H.H.; MURATA, N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. **Trends in Plant Science**, v.13, p.499–505, 2008.

CRUZ, E. M. O. **Época de colheita, Irrigação, Fitoquímica e Atividades Carrapaticida e Fungicida do Óleo Essencial de Genótipos de *Lippia gracilis* Schauer**. Sergipe: UFSE, 2013 87p. (Tese defendida em Biotecnologia)

CRUZ, E. M. O.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; FONTES, S. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BACCI, L.; JESUS, H. C. R.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.. Water Deficit and Seasonality Study on Essential Oil Constituents of *Lippia gracilis* Schauer Germplasm. **The Scientific World Journal**. V.2014, p. 1-9. 2014.

DE SOUZA, A.V.V.; SANTOS, U. S.; CORREA, R. M.; SOUZA, D. D.; OLIVEIRA, F. J. V. Essential Oil Content and Chemical Composition of *Lippia gracilis* Schauer Cultived in the Sub-meddle São Francisco Valley. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. V. 20, N. 4. 2017.

DOMINGHETTI, A. W. et al. Tolerância ao déficit hídrico de Cafeeiros produzidos por estaquia e embriogênese somática. **Coffee Science**, Lavras, v. 11, n. 1, p. 117 – 126. 2016.

EISENHUT, M., et al. Photorespiration Is Crucial for Dynamic Response of Photosynthetic Metabolism and Stomatal Movement to Altered CO₂ Availability. **Molecular Plant**. V. 10, pp. 47–61. 2017. Doi:10.1016/j.molp.2016.09.011. 2017.

FERNANDES, L.C.B. et al. Fungitoxicidade dos extratos vegetais e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker. **Summa Phytopathol.** v. 41, n. 2, p. 153-155, 2015.

FERRAZ, R.P.C.; BOMFIM, D.S.; CARVALHO, N.C.; SOARES, M.B.P.; SILVA, T.B. da; MACHADO, W.J.; PRATA, A.P.N.; COSTA, E.V.; MORAES, V.R.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; BEZERRA, D.P. Cytotoxic effect of leaf essential oil *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine.** V. 20, p.615-621. 2013.

FERREIRA, S.H., BARATA, L.E.S., SALLES, S.L.M., QUEIRÓZ, S.R.R., NETO, N.E.H., CORAZZA, R. & FARIAS, R. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro, **Academia Brasileira de Ciências.** 1998.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 11 Jan. 2018

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química,** v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol. Biochem.,** v. 48, p. 909 – 930. 2010.

GIULIETTI, A.M., R.M. HARLEY, L.P. QUEIROZ, M.R.V. BARBOSA, A.L. BOCAGE NETA & M.A. FIGUEIREDO. 2002. Plantas Endêmicas da Caatinga. p.103-115 In: **Vegetação e Flora das Caatingas** (SAMPAIO, E.V.S.B., A.M. GIULIETTI, J. VIRGÍNIO & C.F.L. GAMARRA-ROJAS, ed.). APNE / CNIP, Recife, PE. 2002.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science,** v.5, n.6, p.709-725, 2011.

LIMA, M.C.L. et al. Composition and biological activities of *Lippia* aff. *Gracilis* essential oil. **Chemistry of Natural Compounds.** V.44, n.2, p.254-256. 2008.

LIMA NETO, M., CUNHA, J.R., FEDERAL, U. Cyclic electron flow, NPQ and photorespiration are crucial for the establishment of young plants of *Ricinus* and *Jatropha curcas* exposed to drought. **Plant Biology.** doi:10.1111/ijlh.12426. 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MARINHO, M.J.M.; ALBUQUERQUE, C.C.; MORAIS, M.B.; SOUZA, M.C.G.; SILVA, K.M.B. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. V. 13, pp. 246-252, 2011.

MARRETO, R. N.; et al. Thermal analyses and gás chromatography coupled mass spectrometry analyses of hidroxipropylmetry analyses of hidroxipropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta**. v. 475. p.53-58. 2008.

MATOS, F.J.A. et al. Medicinal plants northeast Brazil containing thymol and carvacrol - *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracilis* H. B. K (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.11, p.666-8, 1999.

MATOS, F. J. A. et al. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2. ed. Fortaleza: Ed. UFC. P. 445. 2004.

MELO, C. R. et al. Toxicity of essential oils of *Lippia gracilis* chemotypes and their major compounds on *Diaphania hyalinata* and non-target species. **Crop Protection**. V. 104, pp. 47-51. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: MS, 2006, 60p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Caatinga. <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>. Em 09 de abril de 2014. Brasília. 2014.

MITTERMEIER, R.; SCARANO, F. 2013. Ameaças globais à biodiversidade de plantas. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. Livro Vermelho da Flora do Brasil. 1. ed. - Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. p. 20-25.

MORAES, V. R. S.; THOMASI, S. S.; SPRENGER, R. F.; PRADO, V. M. J.; CRUZ, E. M. O.; CASS, Q. B.; FERREIRA, A. G.; BLANK, A. F. Secondary Metabolites from an Infusion of *Lippia gracilis* Schauer Using the LC-DAD-SPE/NMR Hyphenation Technique. **Journal of the Brazilian Chemical**. V.28, n.7. 2017.

NOBRE, P. Mudanças climáticas e desertificação: os desafios para o Estado Brasileiro. **Instituto Nacional do Semiárido (INSA)**. 25-35p.2011.

OLIVEIRA, A.C.L.; ARRIGON-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; BIANCHINI, F.G. Produção de mudas de dois genótipos de alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer) em função de fertilizante mineral, calcário, substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.13, n.1, p.35-42. 2011.

O'LEARY, N; DENHAM, S. S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M. E. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**. V. 170, pp. 97–219. 2012.

PEREIRA, A.C.R.L.; OLIVEIRA, J.V.; JUNIOR, M.G.C.G.; CÂMARA, C.A.G. Atividade inseticidas de óleos essenciais e fixos sobre *Collosobruchus maculatus* (FABR, 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) walp). **Ciência e Agrotecnologia**. V.32, n.3, p.717-724. 2007.

PEZZOPANE, C. G. et al. Estresse por deficiência hídrica em genótipos de *Brachiaria brizantha*. **Ciência Rural**. v.45, n.5, p.871-876. 2015.

PLANCHET, E. et al. Abscisic acid-induced nitric oxide and proline accumulation in independent pathways under water-deficit stress during seedling establishment in *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**. doi: 10.1093/jxb/eru088. 2014.

RIBEIRO, S.S., et al., Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. **Planta Medica** 78, 1601–1606. 2012.

SALIMENA, F.R.G. et al. Verbenaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB246>>. 2015.

SANTELIA, D.; LAWSON, T. Rethinking Guard Cell Metabolism. **Plant Physiology**. V. 172, pp. 1371–1392, 2016.

SANTOS, J. P.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Richness and distribution of useful woody plants in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 72, p. 652 - 663, 2008.

SILVA, M. A.; SANTOS, C. M.; VITORINO, H. S.; RHEIN, A. F.L.; Pigmentos fotossintéticos e índice spad como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 173-181. 2014.

SILVA. N.G.B.; SOUZA, A.V.V.; SOUZA, D.D.; OLIVEIRA, F.J.V. Tipo de estaca e concentração de ácido indol butírico no enraizamento de alecrim da chapada. **Horticultura Brasileira**, v.30, n.2, (Suplemento –CD Rom), p.6016-6022. julho. 2012.

SILVA, P. A.; COSME, V. S.; RODRIGUES, K. C.; DETMANN, K. S.; LEÃO, F. M.; CUNHA, R. L.; BUSELLI, R. A. F.; DAMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A. Drought tolerance in two oil palm hybrids as related to adjustments in carbon metabolism and vegetative growth. **Acta Physiologiae Plantarum**. P. 29-58. 2017. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2354-4>

SILVA, V. N.; SOUTO, L. S.; DUTRA FILHO, J. A.; SOUZA, T. M. A.; BORGES, C. H. A. Deposição de serapilheira em uma área de caatinga preservada no semiárido da Paraíba, Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. V. 10, n.2, p. 21 – 25. 2015.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**. V. 99, n.8, p. 3251-3255. 2008.

SILVEIRA, P. S.; CUSTÓDIO, J. P. C.; SILVA, F. C. M; NASCENTE, A. C. S.; MONTEIRO, C. L. MATOS, F. S. A ação dos brassinosteróides no crescimento de mudas de pinhão manso sob déficit hídrico. **Agri-Environmental Science**. v. 2, n. 1. 2016.

SOUZA, A.V.V.; SILVA, N.G.B.; SOUZA, D.D.; OLIVEIRA, F.J.V.; BISPO, L. dos P. Propagação vegetativa do alecrim de tabuleiro visando a produção comercial de mudas. **Horticultura Brasileira**, v.30, n.2, p.5973-5978. 2012.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v.15, p.89–97, 2010.

TALBI, S.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; HERNÁNDEZ, A.; TERRÓN, L.; FERCHICHI, A.; SANDALIO, L. M.; Drought tolerance in a Saharian plant *Oudneya africana*: Role of antioxidant defences. **Environmental and Experimental Botany**. V. 111, p. 114-126. 2015.

TREVISAN, M. T. S.; MARQUES, R. A.; SILVA, M. G. V.; SCHERER, D.; HAUBNER, R.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W.. Composition of Essential Oils and Ethanol Extracts of the

Leaves of *Lippia* Species: Identification, Quantitation and Antioxidant Capacity. **Records of Natural Products**. V. 10:4, p. 485-496. 2016.

WAHID, A. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. **Journal of Plant Research**, Faisalabad, v. 120, n. 2, p. 219-228. 2007.

YI, X.-P., et al. Rapid recovery of photosynthetic rate following soil water deficit and re-watering in cotton plants (*Gossypium herbaceum* L.) is related to the stability of the photosystems. **Journal of Plant Physiology**. V. 194, P. 23-34. 2016.

ZARGAR, S. M.; GUPTA, M.; NAZIR, M.; MAHAJAN, R.; MALIK, F. A.; SOFI, N. R.; SHIKARI, A. B.; SALGOTRA, R. K.; Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. **Plant Gene**. V. 25. 2017.

ZHANG, C., ZHAN, D.X., LUO, H.H., ZHANG, Y.L., ZHANG, W.F. Photorespiration and photoinhibition in the bracts of cotton under water stress. **Photosynthetica** 54, 12–18. doi:10.1007/s11099-015-0139-9. 2016.

CAPÍTULO II

Respostas morfofisiológicas e bioquímicas de *Lippia gracilis* (Verbenaceae) frente ao déficit hídrico.

2
3 Article Type:

4 Research paper

5
6 Title:

7 **Morphophysiological and biochemical responses of *Lippia gracilis* (Verbenaceae) to**
8 **water deficit**

9 Authors:

10 Luiz Palhares Neto¹, Marciana Bizerra de Moraes², Emília Cristina Pereira Arruda³, Cynthia
11 Cavalcanti de Albuquerque², Terezinha Rangel Camara¹, Cláudia Ulisses^{1*}

12 Authors Institution:

13 ¹ Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
14 Recife, PE 52171-900, Brazil

15 ² Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Rio Grande
16 do Norte, Mossoró, RN 59.610-210, Brazil

17 ³ Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco,
18 Recife, PE 50670-901, Brazil

19
20 *Corresponding author:

21 Cláudia Ulisses (claulisses@hotmail.com; +55 81 3320 6366)

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34 **Respostas morfofisiológicas e bioquímicas de *Lippia gracilis* (Verbenaceae) frente ao**
35 **déficit hídrico**

36 **RESUMO**

37 No presente estudo, buscou-se investigar as respostas morfofisiológicas e bioquímicas da espécie
38 *Lippia gracilis* Schauer frente à condição de déficit hídrico. Plantas provenientes de estacas foram
39 submetidas a dois regimes hídricos, com e sem suspensão de rega durante 15 dias e posteriormente
40 foram reidratadas por 10 dias. Durante os períodos sob regimes hídricos, foram realizadas análises
41 fisiológicas, biométricas, bioquímicas e anatômicas. A condição de déficit hídrico afetou
42 negativamente o crescimento da parte aérea e da área foliar, com reduções aproximadas de 60% e
43 50%, respectivamente, enquanto que o crescimento do sistema radicular foi estimulado pelo estresse
44 (aumento de 500%). A condição de seca ocasionou a redução dos parâmetros fisiológicos
45 (condutância estomática - g_s , transpiração - E , fotossíntese líquida - A e teor relativo de água foliar -
46 TRA), enquanto que a temperatura foliar e a razão da concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a)
47 aumentaram. Plantas submetidas ao estresse apresentaram maior eficiência intrínseca do uso da água
48 no 10º dia de suspensão (A/g_s). Os teores de clorofila total, carotenoides e carboidratos solúveis,
49 foram aumentados no 10º e 15º dia de suspensão hídrica. Os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2),
50 proteínas e malonaldeído (MDA) foram elevados em plantas submetidas ao déficit hídrico no 15º
51 dia de suspensão. Os níveis de H_2O_2 nas plantas controle foram aumentados no 20º e 25º de
52 reidratação, acompanhados da ativação de algumas enzimas do sistema antioxidativo (SOD –
53 superóxido dismutase, CAT – catalase e APX – ascorbato peroxidase), enquanto que nas plantas sob
54 déficit hídrico a SOD aumentou sua atividade no 10º dia e a CAT no 10º e 15º dia sob estresse.
55 Plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram redução da espessura do mesofilo, menores células
56 epidérmicas, redução dos espaços intercelulares, maior quantidade dos feixes vasculares, maior
57 lignificação das células xilemáticas e modificação morfológica das células corticais. Na reidratação,
58 as plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram recuperação em todas as variáveis analisadas.
59 Diante dos resultados, conclui-se que a rápida recuperação dos parâmetros avaliados na espécie
60 estudada pode estar relacionada com a ausência de danos irreversíveis nas estruturas celulares, devido
61 a eficiência do sistema antioxidativo e de processos metabólicos envolvidos com a dissipação do
62 excesso de energia em decorrência do estresse hídrico imposto. Aliado a isso, outras estratégias
63 morfofisiológicas importantes como o aumento no crescimento radicular, aumento na quantidade dos
64 feixes vasculares e redução da área foliar, proporcionaram maior eficiência na absorção de água do
65 solo e na manutenção do conteúdo hídrico celular em plantas de *Lippia gracilis* submetidas ao déficit
66 hídrico.

67 **Palavras-chaves:** Sistema antioxidativo; anatomia foliar; osmorregulação; trocas gasosas; pigmentos;
68 floresta tropical sazonal seca.

69 1. Introdução

70 A Floresta Tropical Sazonal Seca (FTSS) brasileira, também conhecida como Caatinga,
71 cobre a maior parte do nordeste brasileiro, apresentando uma rica biodiversidade vegetal que
72 desempenha grande importância em diversas atividades econômicas do país, especialmente
73 no ramo farmacêutico (Ministério do Meio Ambiente, 2014). A utilização de plantas
74 medicinais é um hábito antigo da população mundial, sendo para muitas pessoas, a única
75 fonte de prevenção, tratamento e cura de muitas doenças (Silva, 2011).

76 Diversas espécies de plantas medicinais são encontradas na FTSS, chegando a compor
77 65,57% de sua vegetação total (Santos et al., 2008), dentre essas plantas medicinais,
78 destacam-se as da família Verbenaceae, que compreendem 98 gêneros e mais de 2.614
79 espécies distribuídas no mundo, dentre as quais muitas são exclusivamente brasileiras.
80 Espécies pertencentes a essa família, principalmente as do gênero *Lippia*, apresentam notável
81 atividade antimicrobiana, devido à constituição química, que na grande maioria apresenta
82 constituintes fenólicos (Moraes et al., 2017; Souza et al., 2017; Lima et al. 2013; Melo et al.
83 2013).

84 A espécie *L. gracilis* Schauer, é endêmica do Nordeste brasileiro (Gomes, 2011;
85 Lorenzi, 2008) e suas folhas apresentam um odor forte e agradável, caracterizado pela
86 presença de óleo essencial, armazenados e secretados por tricomas glandulares (Marinho et
87 al., 2011). As propriedades farmacêuticas resultantes do óleo essencial dessa espécie, devem-
88 se à presença dos compostos timol e carvacrol (Trevisan et al., 2016; Bitu et al., 2015),
89 compostos majoritários aos quais se atribui as ações antimicrobiana, antioxidante e de
90 atividade antitumoral (Cruz et al., 2013; Ferraz et al., 2013; Marreto et al., 2008).

91 A utilização dos recursos naturais de forma indiscriminada, pelas indústrias e
92 população local, ameaça a preservação de diversas espécies endêmicas da FTSS (Silva et al.,
93 2015). Em 2014, o Ministério do Meio Ambiente estimou que 46% da área total da FTSS
94 brasileira tenha sido desmatada. Aliada a essa problemática, a localização desse ecossistema
95 se dá em um domínio de climas semiáridos e caracteriza-se pela irregularidade e baixa taxa
96 de precipitação pluvial, associada à elevada demanda evaporativa, o que limita a
97 produtividade das plantas (Silva et al., 2015). Neste aspecto, mecanismos adaptativos de
98 ordem morfológica, fisiológica, anatômica e bioquímica foram desenvolvidos pelas plantas
99 para tolerar fatores abióticos adversos.

100 A deficiência hídrica promove uma condição estressante que provoca alterações
101 metabólicas nas plantas, gerando diferentes respostas, tais como: aumento do sistema
102 radicular, proporcionando a maior eficiência na absorção de água em períodos secos
103 (Ajithkumar & Panneerselvam, 2014); mudanças na dinâmica de abertura e fechamento dos
104 estômatos, ocasionando redução das taxas transpiratórias e fotossintéticas (Yi et al., 2016;
105 Cerqueira et al., 2015); produção e acúmulo de compostos osmorreguladores, como os
106 carboidratos solúveis, importantes no processo da manutenção da turgescência celular,
107 devido a redução do potencial hídrico da célula (Dominghetti et al, 2015; Cavatte et al.,
108 2012). Além disso, algumas respostas anatômicas, tais como a redução da espessura do
109 mesofilo e aumento no crescimento nos feixes vasculares das folhas são observados em
110 plantas submetidas a condições de déficit hídrico (Silva et al., 2017). Ademais, a eficiência
111 do sistema antioxidativo enzimático, frente à elevada produção de espécies reativas de
112 oxigênio decorrente de estresses abióticos, é um importante mecanismo bioquímico para
113 manutenção da homeostase redox e sobrevivência da planta (Barbosa et al., 2014).

114 Frente ao exposto, objetivou-se nesse trabalho compreender os mecanismos
115 morfofisiológicos e bioquímicos adotados por *L. gracilis* frente à irregularidade hídrica, bem
116 como suas estratégias de adaptação que permite a sobrevivência em seu habitat natural, de
117 forma que possibilite informações que possam ser utilizadas em programas de melhoramento
118 genético de plantas.

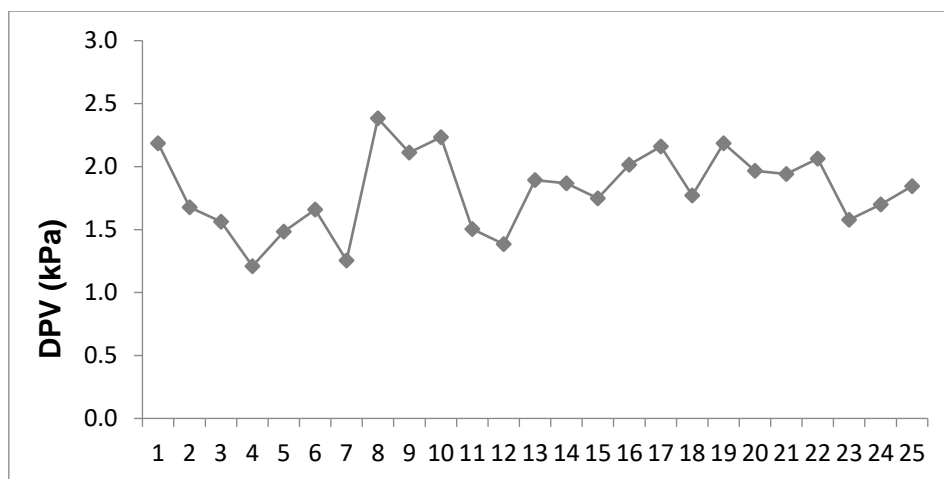
119

120 **2. Materiais e métodos**

121

122 *2.1 Local do experimento*

123 O experimento foi realizado em casa-de-vegetação do Departamento de Química, na
124 área de Química Agrícola da Universidade Federal Rural de Pernambuco, nos meses de
125 fevereiro e março de 2017. Durante o período do experimento o déficit de pressão de vapor
126 (DPV) (fig. 1) foi calculado baseado nos dados de temperatura e umidade coletados.



127

128 **Fig. 1.** Déficit de pressão de vapor (DPV) obtido no período do experimento (Fevereiro e Março/2017).

129

130

2.2 Material vegetal

131 Inicialmente 100 estacas lenhosas retiradas da região mediana de plantas adultas de *L.*
 132 *gracilis*, provenientes do Município de Mossoró, pertencente ao Estado do Rio Grande do
 133 Norte, medindo aproximadamente 25 cm, tiveram suas bases imersas em água durante 24
 134 horas, e posteriormente foram transferidas para uma solução de ácido indol-3-butírico (IBA)
 135 na concentração de 1,5 mg L⁻¹, onde permaneceram durante 10 minutos. Após esse
 136 tratamento, as estacas foram plantadas em sacos de polietileno com capacidade para 15 litros
 137 contendo uma mistura de areia lavada e esterco de caprino curtido, na proporção de 2:1,
 138 respectivamente. Dois meses após o plantio das estacas, as plantas foram submetidas a dois
 139 diferentes tratamentos hídricos: com irrigação (80% da capacidade de pote/saco) e suspensão
 140 total da rega, durante 15 dias. Após esse período, as plantas foram reidratadas durante 10
 141 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, perfazendo 2 regimes
 142 hídricos (com irrigação e suspensão total de rega), contendo 50 repetições por tratamento.
 143 Durante o experimento foram realizadas análises biométricas, fisiológicas, bioquímicas e
 144 anatômicas.

145

146

2.3 Avaliações Biométricas

147 A produção de biomassa seca da parte aérea e da raiz foi medida com o auxílio da
 148 balança analítica. A secagem foi realizada em estufa de aeração forçada a 65°C. Para
 149 obtenção da taxa de crescimento relativo (TCR) do sistema radicular e da parte aérea foi
 150 utilizada a formula abaixo:

151
$$TCR = \frac{\log W_2 - \log W_1}{d_2 - d_1}$$

152 Onde W_2 e W_1 são os pesos do período analisado (d_2) e o dia 0 (d_1), respectivamente.

153 Para determinação da área foliar (AF) foram coletadas folhas jovens totalmente
154 expandidas no primeiro dia (dia 0 - zero), ao 15º e 25º dia do experimento e posteriormente
155 foram digitalizadas para mensuração através do software ImageJ.

156 2.4 Análises Fisiológicas

157 Para analisar o teor relativo da água (TRA) discos foliares foram coletados a cada
158 cinco dias durante os 25 dias do experimento e pesados para obtenção do peso fresco (Pf), em
159 seguida foram hidratados em placas de Petri com papel de filtro embebido por cerca de 24
160 horas e após esse período foi obtido o peso túrgido (Pt), depois disso os discos foram secos
161 em estufa para obtenção do peso seco (Ps). O TRA foi obtido através da fórmula:

162
$$TRA = \frac{Pf - Ps}{Pt - Ps} \times 100$$

163

164 Os parâmetros de trocas gasosas (Condutância estomática - g_s , transpiração - E e
165 fotossíntese líquida - A , Temperatura foliar - $^{\circ}C$, razão de concentração interna e externa de
166 CO_2 - C_i/C_a , eficiência do uso da água - A/E e eficiência intrínseca do uso da água - A/g_s)
167 foram realizados entre o período das 9h as 10h em folhas completamente expandidas do
168 terceiro ramo, através de um analisador de gás a infravermelho (IRGA - *Infrared Gas*
169 *Analyzer*) modelo 6400 (Li-COR, Lincoln, NE, USA).

170 2.5 Análises Bioquímicas

171 2.5.1 Teores de pigmentos e carboidratos solúveis totais

172 O teor de clorofila total (a e b) e carotenoides foram determinados segundo Bezerra
173 Neto e Barreto (2011) com modificações. Aproximadamente 0,2 g de amostra de folhas
174 foram triturados em presença de acetona (80%). Os extratos foram filtrados, usando uma tela
175 de náilon fina, para balão volumétrico de 25 mL. Uma alíquota de 10mL do filtrado foi
176 centrifugado por 10 minutos a 2.000g. Em seguida as leituras foram realizadas em
177 espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645 nm e 663 nm para as clorofilas b e a ,
178 respectivamente. A leitura para quantificação de carotenoides foi realizada a 470 nm. Foram

179 calculados os teores de clorofila *a* e *b* e carotenoides na amostra vegetal através de equações
180 e os resultados foram expressos em g.kg⁻¹ massa fresca.

181 A determinação analítica de carboidratos solúveis foi realizada pelo método da
182 antrona, conforme descrito Yemm e Willis (1954). Foram utilizados 0,250g de amostra
183 vegetal para o preparo do extrato utilizando 20 mL de etanol a 80%. O material permaneceu
184 sob agitação por 30 minutos e em seguida foi filtrado em tela de náilon de malha fina. O
185 volume do filtrado foi completado para 50 mL utilizando água destilada. Em tubos de ensaio
186 foram pipetados 200µL do extrato que foram mantidos em banho de gelo. Posteriormente
187 foram adicionados 2 mL do reagente específico (antrona), homogeneizados e novamente
188 imersos em banho de gelo. Posteriormente os tubos foram transferidos para banho-maria
189 regulado a 100°C onde permaneceram por 10 minutos para o desenvolvimento da cor.
190 Novamente os tubos foram transferidos para banho de gelo e a leitura foi realizada em
191 espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos em g.kg⁻¹ massa fresca.

192

193 *2.5.2 Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e determinação de peroxidação* 194 *lipídica (MDA)*

195 O teor de H₂O₂ foi determinado de acordo com o método de Loreto e Velikava (2001). As
196 amostras frescas foram maceradas com ácido tricloroacético (TCA) 0,1%, na relação de 1
197 g/10 mL (w:v) e posteriormente centrifugadas a 10.000g por 5 min, a 4°C. Do sobrenadante,
198 retiraram-se 200 µL ao qual foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio 100
199 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de iodeto de potássio. As amostras permaneceram em
200 gelo e no escuro, durante uma hora. Após este período, as amostras foram retiradas do gelo e
201 mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida, foi realizada a
202 leitura em espectrofotômetro a 390 nm. A leitura foi realizada a 390 nm em
203 espectrofotômetro e os resultados expressos em µmol g⁻¹ MF.

204 A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com Heath e Packer (1968), com
205 modificações. A reação foi determinada através da produção de MDA, um metabólito reativo
206 ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Amostras biológicas foram maceradas em TCA 0,1% na
207 proporção de 1 g/10 de tampão, juntamente com 20% de PVPP (polivinilpolipirrolidona). O
208 homogeneizado foi centrifugado a 10.000g durante 5 min a 4°C e em seguida recolhido
209 250µL do sobrenadante e ejetados em tubos criogênicos contendo 1 mL de solução de ácido
210 tiobarbitúrico (0,5%) e ácido tricloroacético (20%). A mistura foi mantida em banho-maria a

211 95°C durante 30 min e em seguida, passou por rápido resfriamento por 10 min. Antes da
212 leitura em espectrofotômetro, as amostras foram centrifugadas por mais 10 min a 10.000g. As
213 leituras foram realizadas a 535 e 600 nm e os resultados foram expressos em $\text{nmol g}^{-1} \text{MF}$.

214

215 2.5.3 *Análise de enzimas antioxidativas*

216 Amostras congeladas foram maceradas e homogeneizadas com tampão fosfato de
217 potássio 100 mM (pH 7,5), 1 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), 3 mM de DL-
218 ditiotreitól e 20% de PVPP sob temperatura de - 4°C na relação de 1 g/3 mL (w:v) (Azevedo
219 et al., 1998). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g durante 30 min e o sobrenadante
220 separado em alíquotas e armazenado a -20°C até a determinação das atividades enzimáticas.
221 A concentração das proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976).

222 A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada conforme proposto por
223 Gianolitis e Reis (1977), com modificações. Por esse método, é determinada a inibição da
224 redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação
225 do cromóforo formazana. A solução de reação (3 mL) foi constituída de 85 mM de tampão
226 fosfato (pH 7,8), 75 μM de NBT, 5 μM riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM EDTA e
227 50 μL de extrato enzimático. A solução foi adicionada em tubos de vidro e irradiada com luz
228 branca (lâmpada fluorescente de 15 W) por 5 min. Após esse período de exposição, a solução
229 foi analisada por espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade foi definida como a quantidade
230 de enzima que inibe em 50% a formação de formazana por grama de proteína, com resultados
231 expressos em U/mg de proteína. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

232 A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi executada conforme descrito por
233 Nakano e Asada (1981). O meio de reação composto por 650 μL de tampão fosfato de
234 potássio 80 mM, pH 7,5, 100 μL de ascorbato 5 mM, 100 μL de EDTA 1 M, 100 μL de H_2O_2
235 1 mM e 50 μL do extrato protéico. A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento
236 da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a 30°C, durante 60 segundos, em
237 espectrofotômetro. A atividade foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar para o
238 ascorbato ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a atividade específica foi dada em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

239 A atividade da CAT foi determinada segundo Havir e Mchale (1987) com
240 modificações, conforme Azevedo et al. (1998). Em solução contendo 1 mL de tampão fosfato
241 de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 1 mM.

242 Primariamente foi adicionado 25 μL do extrato proteico, onde a atividade enzimática foi
243 determinada seguindo a decomposição do H_2O_2 por 60 segundos, através das alterações a 240
244 nm, sob temperatura de 25°C , em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em
245 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteínas/min, considerando que uma unidade de catalase decompõe 1 μmol de
246 H_2O_2 por mg de proteína em 1 minuto a pH 7,5.

247 2.6 Análises anatômicas

248 Para avaliação anatômica do mesofilo e da nervura central, lâminas da região mediana
249 da folha foram confeccionadas a partir de material vegetal fixado em solução de FAA 70
250 (Sass, 1951). As amostras foram desidratadas em uma série etílica (Johansen, 1940),
251 infiltradas e incluídas em parafina e seccionadas transversalmente em micrótomo rotativo,
252 cujas secções obtidas com $8\mu\text{m}$ foram coradas com safranina e azul de Alcian (Bukatsch,
253 1972). Os cortes foram analisados em microscópico óptico.

254

255 2.7 Análise estatística

256 Os dados quantitativos do experimento foram submetidos ao teste T ao nível de 5% de
257 probabilidade pelo Programa R.

258

259 3. Resultados

260 3.1 Avaliações Biométricas

261 Plantas sob suspensão hídrica apresentaram maior crescimento relativo (TCR) do
262 sistema radicular tendo um aumento de aproximadamente 500% na sua biomassa (fig. 2C e
263 tabela 1), enquanto que o TCR da parte aérea foi afetado negativamente entre o 5° e 15° dia
264 de suspensão hídrica, com redução de aproximadamente 60%, demonstrando início de
265 recuperação no 25° dia (período de reidratação), triplicando sua produção de biomassa (fig.
266 2D e tabela 1) quando comparadas com plantas com irrigação contínua, as quais
267 apresentaram um crescimento contínuo e proporcional da parte área e raiz (fig. 3A e 3B;
268 tabela 1). Outra variável afetada pela escassez hídrica foi a área foliar, em que plantas sob
269 condição de estresse, apresentaram redução da área foliar ($\simeq 50\%$), mas no período de
270 reidratação apresentou rápida recuperação, enquanto que plantas controle apresentaram
271 incremento na área foliar aos 15 dias ($\simeq 50\%$) e redução no 25° dia ($\simeq 60\%$) (tabela 2).



272

273 **Fig. 2.** Plantas de *Lippia gracilis*: (A e B) irrigadas aos 15 e 25 dias, respectivamente; (C e D) submetidas ao
 274 déficit hídrico, no 15º de suspensão da irrigação e na reidratação aos 25 dias, respectivamente. Barra: 10 cm.

275

276 **Tabela 1.** Taxa de crescimento relativo (TCR) da parte aérea (P.A.) e da raiz de *Lippia gracilis* Schauer no 5º dia
 277 (exposição ao déficit hídrico), 15º dia (período máximo de exposição ao déficit hídrico) e 25º dia (reidratação).
 278 Os valores representam a média de três repetições. As letras indicam diferenças entre os tratamentos hídricos
 279 nos diferentes tempos avaliados.

Período	TCR P.A. (g.g ⁻¹ dia ⁻¹)		TCR RAIZ (g.g ⁻¹ dia ⁻¹)	
	Controle	Estresse	Controle	Estresse
0 - 5º	0,045 a	0,048 a	0,035 b	0,059 a
5º - 15º	0,074 a	0,020 b	0,099 b	0,302 a
15º - 25º	0,135 a	0,077 b	0,176 a	0,037 b

280

281

282

283

284

285

286

287 **Tabela 2.** Área foliar de *Lippia gracilis* Schauer avaliada no dia 0 (zero) (antes da exposição ao déficit hídrico);
 288 15° dia (período máximo de exposição ao déficit hídrico) e 25° dia (período de reidratação). Os valores
 289 representam a média de três repetições. As letras indicam diferenças entre os tratamentos hídricos nos diferentes
 290 tempos avaliados.

ÁREA FOLIAR (cm ²)		
Dia(s)	Controle	Estresse
0	23,64 a	22,81 a
15°	35,54 a	10,83 b
25 °	21,34 a	21,92 a

291

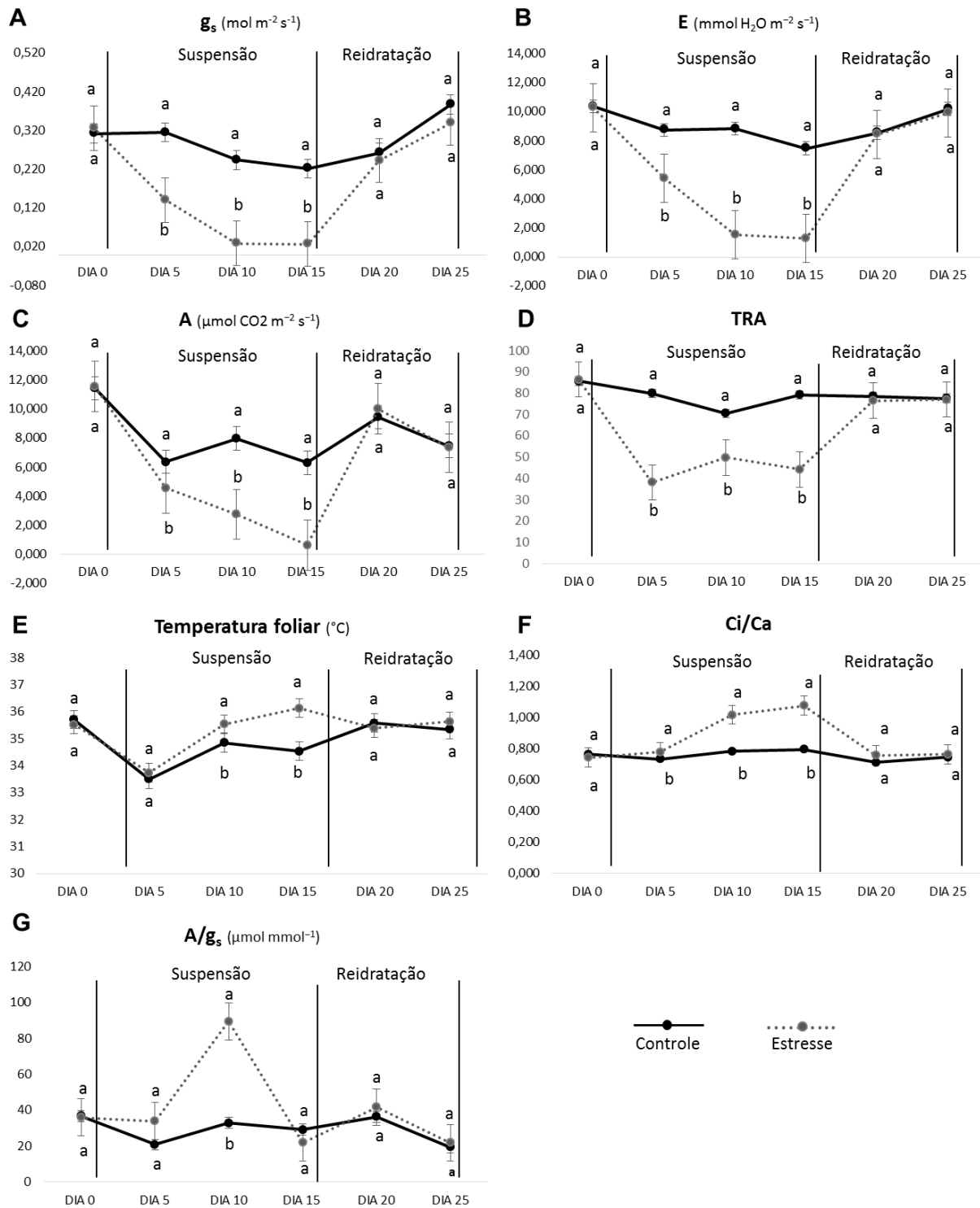
292

293 3.2 Avaliações Fisiológicas

294 A condição de déficit hídrico resultou na redução da condutância estomática (g_s),
 295 consequentemente um declínio na taxa de transpiração (E), fotossíntese líquida (A) e teor
 296 relativo de água na folha (TRA) (fig. 3A, B, C e D). A temperatura foliar e a razão de
 297 concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) foi aumentada em plantas sob déficit hídrico
 298 no 10° e 15° dia de suspensão hídrica (fig 3E e F). A eficiência do uso intrínseco da água
 299 (A/g_s) aumentou em plantas estressadas no 10° dia de suspensão hídrica, reduzindo,
 300 posteriormente, até o 15° dia (fig 3G). Apesar do estresse hídrico imposto durante 15 dias ter
 301 proporcionado a murcha das folhas (Fig. 2C), foi observado a recuperação da turgescência
 302 em algumas horas (\approx 12 horas) após a reidratação. No geral, durante o período de reidratação
 303 os parâmetros avaliados retornaram ao nível do controle, demonstrando assim, que a espécie
 304 estudada apresenta uma rápida recuperação dos parâmetros fisiológicos frente ao déficit
 305 hídrico no período avaliado.

306

307

308
309

310 **Fig. 3.** A - Condutância estomática (g_s); B - Transpiração (E); C - Fotossíntese líquida (A); D - Teor relativo de
 311 água na folha (TRA); E - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) foliar; F - Razão da concentração interna e externa de CO_2 (Ci/Ca);
 312 G - Eficiência do uso intrínseco da água (A/g_s) em plantas de *Lippia gracilis* Schauer submetidas a dois regimes
 313 hídricos: com rega (controle) e suspensão total da irrigação (estresse). Os valores representam a média de três
 314 repetições. As letras indicam diferenças entre os tratamentos hídricos nos diferentes tempos avaliados.

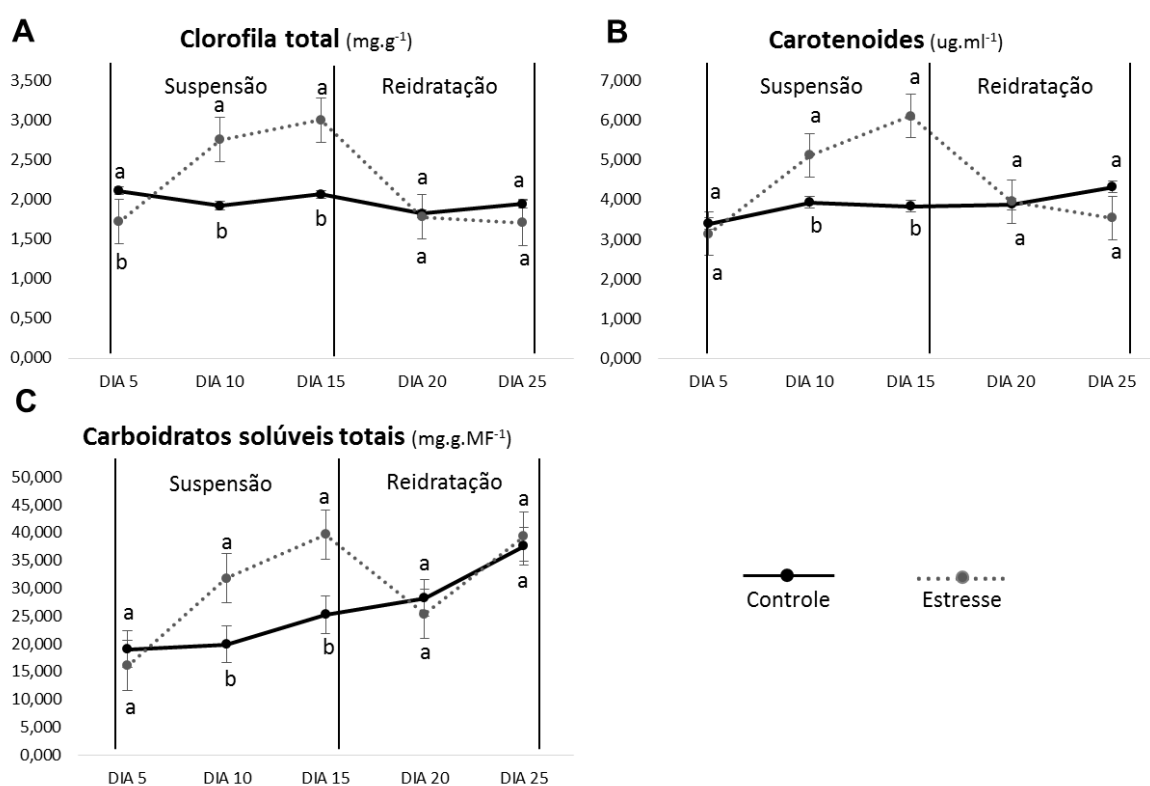
315

316 3.3 Avaliações Bioquímicas

317 3.3.1 Teores de pigmentos e carboidratos solúveis totais

318 A produção dos pigmentos: clorofilas totais e carotenoides, foi maior em plantas
 319 submetidas ao déficit hídrico no 10º (~ 62% e 65%, respectivamente) e 15º dia (~ 75% e
 320 95%, respectivamente) e, posteriormente, foi reduzida ao nível de plantas controle na
 321 reidratação (fig. 4 A e B). Resultados semelhantes foram observados para o teor de
 322 carboidratos solúveis totais, com aumento de aproximadamente 98% no 10º dia e 128% no
 323 15º (fig. 4 C).

324



325

326 **Fig. 4.** A - Teores de carboidratos solúveis totais; B - Clorofila total; C - Carotenoides em plantas de *Lippia*
 327 *gracilis* Schauer submetidas a dois regimes hídricos: com rega (controle) e suspensão total da irrigação
 328 (estresse). Os valores representam a média de três repetições. As letras indicam diferenças entre os tratamentos
 329 hídricos nos diferentes tempos avaliados.

330

331

332

333

334

335 3.3.2 Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e determinação de peroxidação
336 lipídica (MDA)

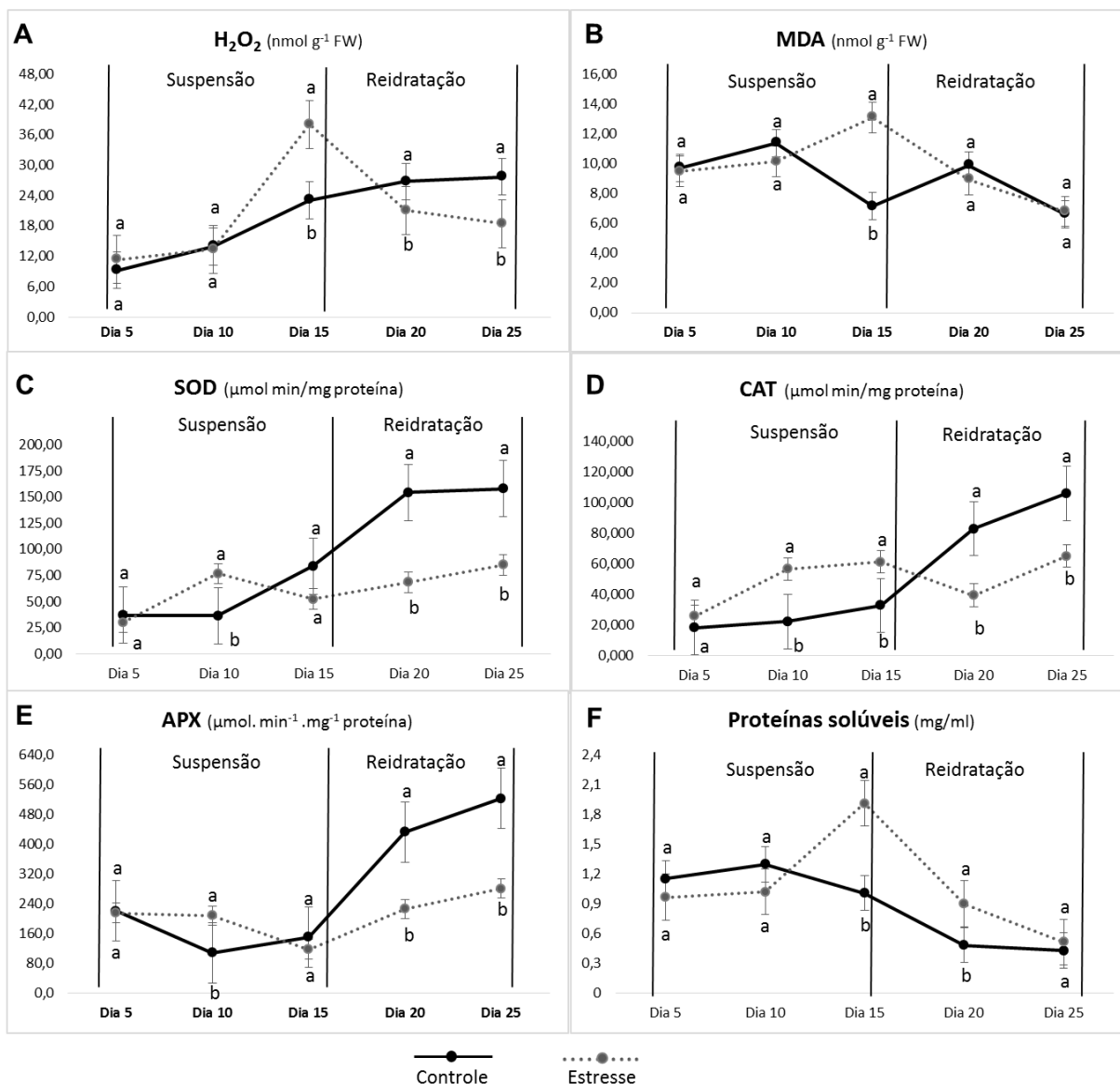
337 A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA) foram
338 acentuadas em plantas submetidas ao déficit hídrico aos 15 dias de suspensão de rega, com
339 aumento de aproximadamente 232% e 38%, respectivamente (fig. 5 A e B), enquanto que as
340 plantas irrigadas apresentaram um crescimento linear gradativo de H_2O_2 a partir do 10º dia do
341 experimento. Os teores de H_2O_2 e MDA foram atenuados no período de reidratação em
342 plantas submetidas ao déficit hídrico (fig. 5A e 5B).

343 3.3.3 Análise de enzimas antioxidativas

344 O sistema enzimático antioxidante, representado pela atividade da superóxido
345 dismutase (SOD), da ascorbato peroxidase (APX) e da catalase (CAT), apresentou diferenças
346 significativas nas respostas em função do tempo de exposição ao déficit hídrico (fig. C, D e
347 E). Nas plantas analisadas no 10º dia de estresse, foram observados incrementos
348 significativos na atividade da SOD (\simeq 156%), geradora de H_2O_2 , o que sugere presença de
349 radical superóxido. Para a catalase (CAT) esse incremento no combate às ROS foi observado
350 no 10º e 15º dia de suspensão hídrica (\simeq 120% e 138%, respectivamente). Já a atividade da
351 ascorbato peroxidase (APX) não teve sua atividade influenciada pelo déficit hídrico. Em
352 contrapartida, um comportamento marcante foi observado nas plantas controle, em que o
353 sistema antioxidativo enzimático (SOD, CAT e APX) ganhou evidência no 20º e 25º dia do
354 experimento (fig. 5C, 5D e 5E).

355 O teor de proteínas solúveis foi aumentado em plantas submetidas ao déficit hídrico
356 no máximo período de restrição hídrica (\simeq 118%), posteriormente atenuado no período de
357 reidratação, enquanto que plantas controle tiveram uma redução gradativa de proteínas a
358 partir do 10º dia (fig. 5F).

359



360

361 **Fig. 5.** A - Teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); B - Malonaldeído (MDA); C - Atividade das enzimas
 362 superóxido dismutase (SOD); D - Catalase (CAT); E - Ascorbato peroxidase (APX); F - Teor de proteínas
 363 solúveis em plantas de *Lippia gracilis* Schauer submetidas a dois regimes hídricos: com rega (controle) e
 364 suspensão total da irrigação (estresse). Os valores representam a média de três repetições. As letras indicam
 365 diferenças entre os tratamentos hídricos nos diferentes tempos avaliados.

366

367 3.4 Avaliações anatômicas

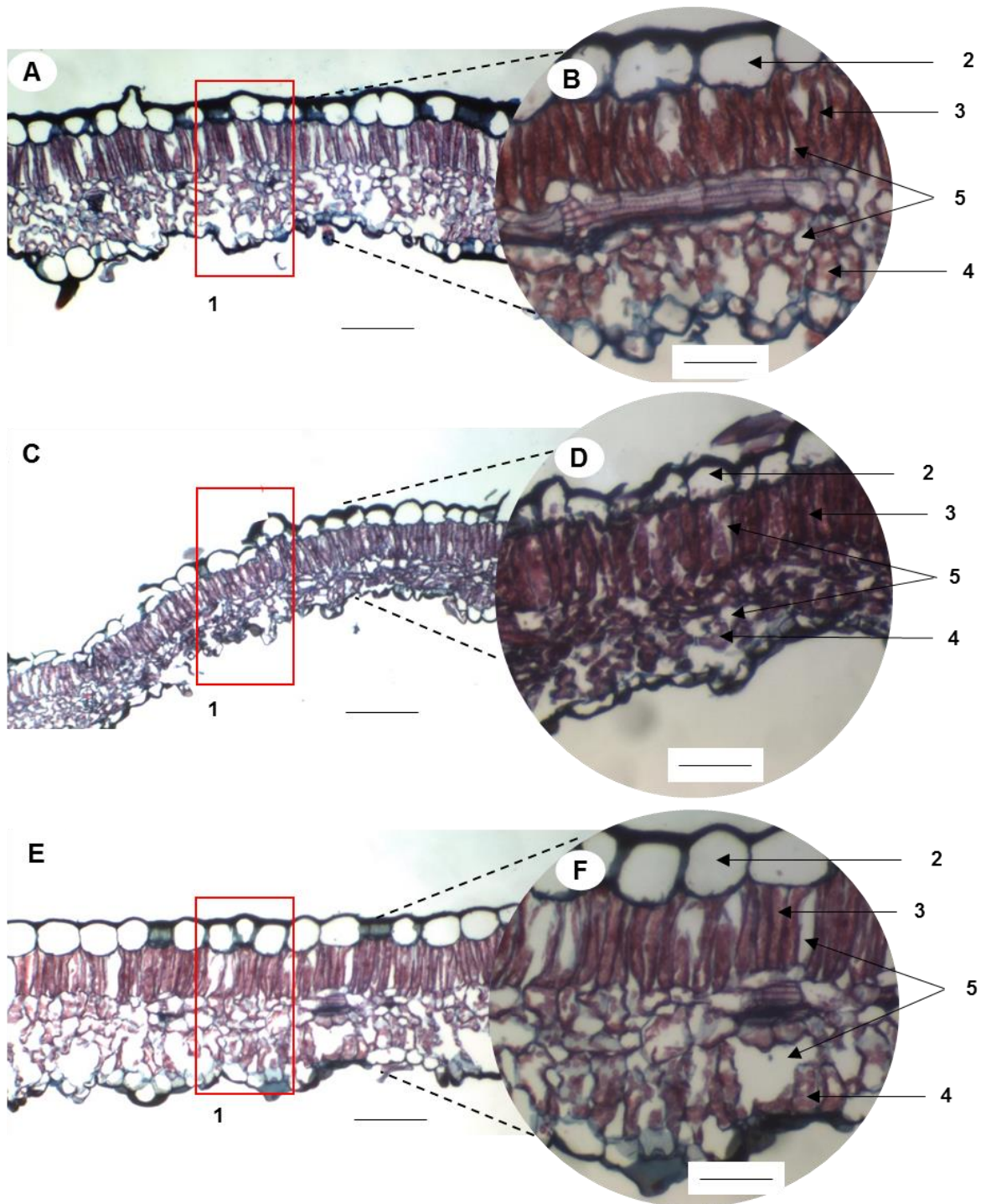
368 As folhas de plantas em condições de déficit hídrico apresentaram células epidérmicas
 369 menores (fig. 6 D2), redução da espessura do mesofilo (fig. 6 C1) e menores espaços entre as
 370 células parenquimáticas do mesofilo (fig. 6 D5) em comparação com folhas hidratadas (fig.
 371 B2, A1 e B5, respectivamente). Não foram observadas diferenças morfológicas nas células do
 372 mesofilo das folhas avaliadas, sendo ambas do tipo dorsiventral, apresentando células do

373 parênquima paliádico na região superior e do lacunoso na região inferior (fig. 6 B3/4 e
374 D3/4).

375 Plantas submetidas ao estresse hídrico apresentaram maior investimento na
376 quantidade dos feixes vasculares centrais e acessórios (fig. 7 C2 e C3, respectivamente),
377 sendo observada uma maior lignificação do tecido xilemático, em comparação com folhas
378 hidratadas (fig. 7 A2 e A3, respectivamente). As células do parênquima cortical de folhas
379 hidratadas apresentaram morfologia arredondada e maiores espaços extracelulares (fig. 7 A1
380 e B4, respectivamente) em comparação com folhas de plantas submetidas ao regime hídrico,
381 as quais apresentaram células parenquimáticas adensadas, com morfologia alterada (fig. 7 C1
382 e D4). Observou-se ainda que a epiderme da face abaxial da nervura central das folhas
383 estressadas apresentou aspecto sinuoso (fig. 7 C5).

384 Após 10 dias da reidratação, as células do mesofilo e da nervura central das plantas
385 submetidas ao estresse, recuperaram suas características anatômicas, assemelhando-se às
386 plantas sempre hidratadas (fig. 6 E/F e 7E/F).

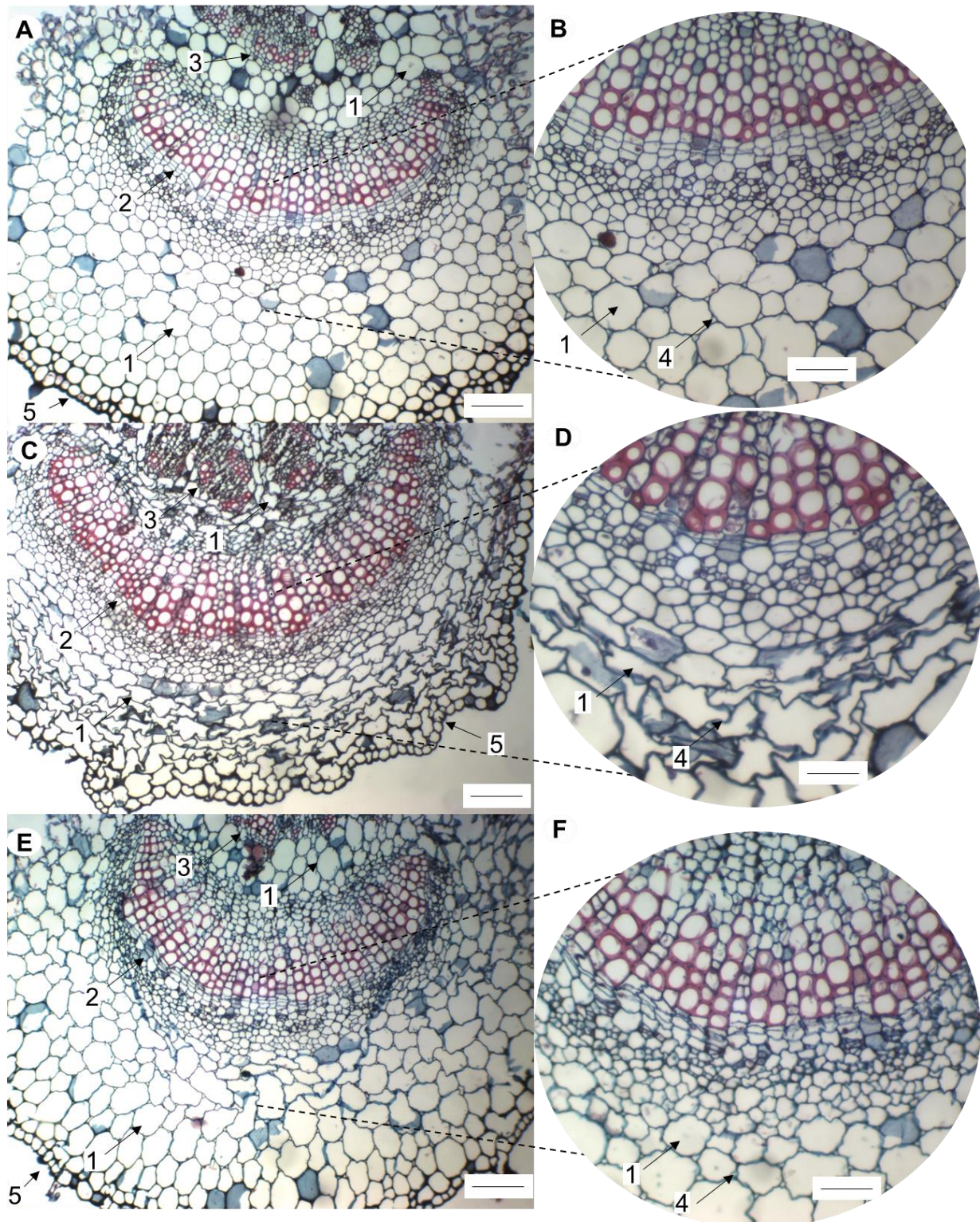
387



388

389 **Fig. 6.** Cortes transversais do mesofilo de folhas de plantas de *Lippia gracilis* Schauer submetidas a dois
 390 regimes hídricos: (A e B) plantas sempre hidratadas; (C e D) Plantas submetidas ao déficit hídrico aos 15 dias de
 391 suspensão de rega; (E e F) plantas submetidas ao déficit hídrico após 10 dias de reidratação. Caracteres
 392 anatômicos: (1) espessura do mesofilo; (2) células epidérmicas na face adaxial; (3) parênquima paliçádico; (4)
 393 parênquima lacunoso; (5) espaços extracelulares. Barra: 50 μ m (A, C e E) e 20 μ m (B, D e F).

394



395
396

397 **Fig. 7.** Cortes transversais da nervura central de folhas de plantas de *Lippia gracilis* Schauer submetidas a dois
 398 regimes hídricos: (A e B) plantas sempre hidratadas; (C e D) Plantas submetidas ao déficit hídrico aos 15 dias de
 399 suspensão de rega; (E e F) plantas submetidas ao déficit hídrico após 10 dias de reidratação. Caracteres
 400 anatômicos: (1) células parenquimáticas; (2) feixe vascular central; (3) feixes vasculares acessórios; (4) espaços
 401 extracelulares; (5) epiderme adaxial. Barra: 50 µm (A, C e E) e 20 µm (B, D e F).

402

4. Discussão

403
404 A escassez hídrica é um dos fatores de maior impacto que limita o crescimento e
405 desenvolvimento de diversas espécies de plantas, acarretando de imediato a perda da
406 turgescência celular (Dominghetti et al., 2016; Cerqueira et al., 2015; Afzal et al., 2014).
407 Nessas condições, as plantas tenderam a direcionar seus recursos para mecanismos voltados à
408 sua sobrevivência, como o maior desenvolvimento das raízes e a redução da área foliar,
409 importantes estratégias para aumentar a área de absorção no solo e reduzir a perda de água
410 por transpiração, respectivamente, retardando o processo de desidratação celular (Silva-
411 Pinheiro et al., 2016; Aranda et al., 2015; Ajithkumar & Panneerselvam, 2014). A redução da
412 área foliar, pode ainda ter influenciado a fotossíntese, limitando a produção de biomassa,
413 devido à queda na fixação de CO₂ e na intercepção da luz, respectivamente (Silveira et al.,
414 2016).

415 A ausência de danos causados pelo estresse hídrico no sistema radicular de plantas
416 submetidas ao estresse, associado ao baixo potencial hídrico foliar ocasionado pela produção
417 e acúmulo de osmorreguladores, como carboidratos solúveis (fig. 4C), podem ter
418 influenciado na rápida recuperação da turgescência na *Lippia gracilis*. A recuperação da
419 turgescência proporciona o restabelecimento dos parâmetros fisiológicos, que por sua vez
420 influenciam positivamente na recuperação das variáveis de crescimento, como observado na
421 TCR da parte aérea das plantas submetidas ao déficit hídrico no período de reidratação, ao
422 25º dia (tabela 1). Moléculas osmorreguladoras são responsáveis pela dinâmica da abertura e
423 fechamento dos estômatos, devido à redução do potencial hídrico celular (Anjum et al.,
424 2017). Dentre essas moléculas destacam-se os íons inorgânicos, potássio (K⁺) e cloreto (Cl⁻),
425 além de moléculas orgânicas como carboidratos, sendo a sacarose a mais abundante (Santelia
426 e Lawson, 2016).

427 Nas plantas, o açúcar é utilizado no metabolismo relacionado ao crescimento,
428 significando fornecimento de energia mediante o processo de oxidação biológica, bem como
429 esqueleto carbônico. Em condições de estresse hídrico no experimento, a elevação do teor de
430 carboidratos pode refletir um acúmulo de osmorreguladores para minimizar os efeitos de
431 estresse, promovendo a redução do potencial hídrico celular a nível do solo, retardando a
432 desidratação celular e atenuando os efeitos nocivos do estresse hídrico (Roxana et al., 2014).
433 Esses compostos podem ter sido acumulados devido ao aumento na sua biossíntese ou pela
434 degradação de moléculas maiores, como amido (Santelia e Lawson, 2016). Resultados

435 semelhantes quanto ao aumento no teor de carboidratos foi observado por Dianat et al. (2016)
436 em *Lippia citriodora* em condição de estresse hídrico.

437 A redução das medidas de trocas gasosas é bem documentada quando se trata de
438 déficit hídrico (Silva et al., 2017; Yi et al., 2016; Cerqueira et al., 2015; Gorai et al., 2015;
439 Tatagiba et al., 2015; Anjum et al., 2011; Wang et al., 2010). O déficit hídrico no solo induz
440 o aumento na síntese do ácido abscísico (ABA) ocasionando o fechamento estomático,
441 visando à redução da taxa transpiratória, reduzindo assim, a perda de água e por outro lado
442 limita o fluxo de entrada de CO₂ no mesófilo, o que influencia negativamente a fotossíntese
443 (Silveira et al., 2016; Savchenko et al., 2014). O aumento da concentração interna de CO₂ em
444 plantas em condições de déficit hídrico (fig. 3 F) pode ter ocorrido devido às alterações
445 morfológicas nas células do mesófilo, como observado na redução dos espaços intercelulares
446 nas células do parênquima paliçádico e lacunoso (fig. 6 D), que impossibilitam a circulação e
447 o uso desse gás na fotossíntese. Além disso, o aumento da atividade fotorrespiratória e da
448 respiração celular também podem contribuir para esse resultado. A redução da transpiração
449 pode acarretar a diminuição do resfriamento foliar e no aumento da temperatura foliar (Pinto
450 et al., 2014), esse último atrelado ao aumento de C_i/C_a , incremento nos teores de peróxido de
451 hidrogênio (H₂O₂) e aumento da atividade da catalase em plantas submetidas ao déficit
452 hídrico (fig. 5A e D, respectivamente) pode indicar a atividade fotorrespiratória (Eisenhut et
453 al., 2017; Voss et al., 2013).

454 Por muito tempo a fotorrespiração foi considerada um processo deletério no
455 metabolismo vegetal, porém vários estudos veem demonstrando sua importância na
456 dissipação do excesso de energia em plantas submetidas ao déficit hídrico (Lima Neto et al.,
457 2017; Eisenhut et al., 2017; Zhang et al., 2016). Esse processo promove a utilização de
458 equivalentes redutores e, conseqüentemente, liberação de moléculas oxidadas, atenuando,
459 assim, a produção excedente de ROS (Eisenhut et al., 2017; Voss et al., 2013). Outro
460 mecanismo fotoprotetor é a atuação de moléculas antioxidativas de ordem não enzimática,
461 como os carotenoides, que além de desempenharem funções importantes no processo
462 fotossintético, atuam também no controle da produção de espécies reativas de oxigênio
463 (ROS) (Barbosa et al., 2014). Esses pigmentos dissipam o excesso energia luminosa em
464 forma de calor, evitando a formação de moléculas instáveis, como o oxigênio singlete (¹O₂),
465 atenuando os danos deletérios nos cloroplastos (Tian et al., 2016; Das and Roychoudhury,
466 2014). Além disso, a síntese do ácido abscísico (ABA) tem como precursor um carotenoide
467 intermediário, sendo em condições de seca severa, esses pigmentos podem ser convertidos

468 nesse fitoregulador (Du et al., 2013), que desencadeará o processo de abscisão das folhas, que
469 constitui uma importante estratégia de plantas características de ambientes áridos e
470 semiáridos (Sabino et al., 2016).

471 O aumento na produção e acúmulo de carotenoides, aliado aos indícios da ativação da
472 fotorrespiração, podem ter auxiliado na conservação estrutural e funcional dos fotossistemas,
473 proporcionando uma recuperação rápida das taxas fotossintéticas (Yi et al., 2016),
474 evidenciando ausência de danos no aparato fotoquímico da *Lippia gracilis*. Após a
475 reidratação, a rápida recuperação das taxas fotossintéticas de *Ephedra alata* sub sp. Alenda
476 (espécie xerófita) foi considerada uma importante estratégia de sobrevivência em ambientes
477 áridos (Gorai et al., 2015).

478 A eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s) observada em plantas em condições de
479 déficit hídrico no 10º dia de suspensão de rega demonstra a eficiência fotossintética dessas
480 plantas em condições de reduzida condutância estomática causada pelo déficit hídrico
481 imposto. Esse resultado também pode estar relacionado com o aumento do teor de clorofilas
482 totais e carotenoides apresentado por essas plantas, pois a capacidade de aumentar a síntese
483 desses pigmentos influencia positivamente na manutenção da atividade fotossintética, sendo
484 considerada uma variável importante na determinação de genótipos tolerantes em condições
485 de estresse moderado (Lakra et al., 2015; Shahbazi, 2015; Sankar et al., 2013).

486 O incremento no teor do malondialdeído (MDA), produto da peroxidação de ácidos
487 graxos polinsaturados de biomembranas, é um importante biomarcador de estresse oxidativo
488 (Anjum et al., 2011). O acúmulo consistente no teor de MDA, foi detectado em tecidos de
489 plantas sob déficit hídrico no máximo período de restrição hídrica e foi acompanhado de
490 elevações significativas de H_2O_2 . No entanto, houve ausência de incremento da atividade da
491 SOD, que atua na dismutação do radical superóxido ($\cdot O_2^-$) gerando peróxido de hidrogênio
492 (H_2O_2), ou seja, esse aumento no teor de H_2O_2 observado no tecido das plantas, aos 15 dias,
493 pode ser proveniente de outros processos metabólicos, como a fotorrespiração, beta-oxidação
494 dos ácidos graxos e ação de enzimas peroxidases presentes na parede celular (Barbosa et al.,
495 2014). Esse quadro também sugere a formação de outras moléculas oxidantes responsáveis
496 pela peroxidação lipídica, como o radical hidroxila ($\cdot OH$), logo, apesar do H_2O_2 não participar
497 diretamente da peroxidação lipídica, sua reação com íons ferrosos (Fe^{2+}) acarretam na
498 formação do $\cdot OH$, responsável, juntamente com o oxigênio singlete (1O_2), pela degradação
499 dos lipídeos de membrana (Sewelam et al, 2016; Gil e Tuteja, 2010). Os Fe^{2+} são produtos da

500 redução do Fe^{3+} pelo $\cdot\text{O}_2^-$, sendo, portanto, a atuação da SOD um importante mecanismo que
501 previne a formação de $\cdot\text{OH}$ (Gil e Tuteja, 2010).

502 Apesar desse quadro observado no período de máximo estresse, não houve danos
503 irreversíveis a nível celular, pois no período da reidratação ocorreu uma rápida recuperação
504 da turgescência e dos demais parâmetros avaliados, demonstrando a eficiência das plantas na
505 prevenção de danos maiores nas estruturas celulares. O elevado teor de proteínas observado
506 em plantas submetidas à condição de déficit hídrico no máximo período de restrição hídrica
507 sugere a capacidade dessas plantas de reprogramação e biossíntese de proteínas responsáveis
508 pela regulação mais efetiva nos mecanismos sensores que desencadeiam organização e
509 sincronia da maquinaria metabólica, garantindo assim um eficiente desempenho frente à
510 adversidade imposta pelo estresse hídrico.

511 A atividade coordenada da SOD, CAT e APX, que se encontram distribuídas em
512 diferentes compartimentos celulares, pode assegurar a eliminação efetiva de moléculas
513 oxidativas nas células das plantas controles no 20º e 25º dia, evitando a difusão de H_2O_2
514 através das membranas para outros locais e indução de alterações oxidativas em diversas
515 moléculas biológicas (Shi et al, 2015). Adequações no metabolismo antioxidativo que resulta
516 em homeostase redox é comprovado pelos níveis controlados de MDA, entretanto, o aumento
517 na atividade das enzimas associado a redução da área foliar (tabela 2) e os elevação dos
518 níveis de H_2O_2 são indicativos da presença de um possível agente limitante para as plantas,
519 atribuído aqui ao espaço físico do vaso de cultivo. Neste aspecto, as plantas com rega
520 contínua apresentaram um elevado crescimento da aérea em comparação com as plantas
521 submetidas ao déficit hídrico no 25º dia (fig. 2), o que sugere que essas plantas apresentavam
522 intensa atividade transpiratória foliar, demandando uma maior quantidade de água a ser
523 absorvida e a conseqüente necessidade de uma maior eficiência do sistema radicular.

524 Quanto às avaliações anatômicas, as modificações morfológicas observadas nas
525 células epidérmicas e do parênquima cortical de folhas estressadas, bem como a redução da
526 espessura do mesofilo e dos espaços intercelulares (fig. 6 e 7) estão relacionadas com a
527 redução do conteúdo hídrico celular. A perda de água nas células ocasiona o encolhimento do
528 protoplasto e o afrouxamento das paredes celulares, proporcionando a modificação da
529 morfologia celular. O processo descrito também é aplicável para o crescimento foliar que
530 também é afetado pela redução da disponibilidade hídrica, conforme observado em plantas
531 submetidas ao estresse no presente estudo (tabela 2).

532 As características acima descritas são similares às observadas em espécies
533 ocorrentes em regiões áridas e semiáridas, que apresentam caracteres morfológicos, também
534 denominado xeromórficos, baseado em dois tipos de estratégias frente ao déficit hídrico: a
535 primeira está relacionada com estruturas que proporcionam a redução das taxas de
536 transpiração e fotossíntese, enquanto que a segunda estratégia visa aprimorar esses dois
537 processos (Fahn and Cutler, 1992). Dentro desse contexto, a redução dos espaços entre as
538 células parenquimáticas do mesófilo (fig. 6 D) pode ser considerada uma alternativa para
539 reduzir a transpiração e garantir uma maior eficiência do uso da água (Silva et al., 2017;
540 Chartzoulakis et al., 2002).

541 Outro carácter xeromórfico que está relacionado com a maior sobrevivência de
542 espécies vegetais em ambientes secos é o maior investimento na quantidade dos feixes
543 vasculares (Aou-ouad et al., 2017; Torres-Ruiz et al., 2017). Esse resultado, observado em
544 plantas estressadas no presente estudo (fig. 7 C), pode estar relacionado com o aumento na
545 eficiência da condução de água, além da redução da ocorrência de cavitação e formação de
546 embolia (Silva et al., 2017; Pinto et al., 2012; Ewers et al., 2007). Resultado semelhante foi
547 observado por Silva et al. (2017) em *Styrax ferrugineus*, onde os autores atribuíram a maior
548 ocorrência de vasos com a sobrevivência dessa espécie em períodos de seca.

549 A ausência de células de suporte nas folhas como esclereídes ou fibras, pode
550 ocasionar o colapso dos tecidos foliares em decorrência da desidratação das células. Esse
551 processo pode ser atenuado pela maior lignificação das células do xilema, observada em
552 folhas desidratadas (fig. 7 C). As células do xilema dos feixes vasculares centrais e acessórios
553 (fig. 7C) atuam como colunas estruturais evitando o adensamento das células
554 parenquimáticas e, conseqüentemente, o colapso das células da folha em condições de déficit
555 hídrico.

556 A recuperação de turgescência das células do mesófilo e da nervura central de folhas
557 estressadas no período de reidratação (fig. 6 E/F e 7 E/F), associada a recuperação dos
558 parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliados demonstram a tolerância de *Lippia gracilis*
559 frente ao déficit hídrico imposto. De forma geral, partes das respostas foram reguladas na
560 seleção de vias alternativas em que a taxa de fotossíntese, respiração celular e a taxa de
561 crescimento foram ajustadas, concomitante com a síntese de proteínas, ativação de algumas
562 moléculas antioxidativas enzimáticas e não enzimáticas, ajuste osmótico, através do acúmulo

563 de carboidratos solúveis, e eficiência na absorção e translocação da água, evidenciado pelo
564 maior crescimento do distema radicular e maior número de feixes vasculares.

565

566 **5. Conclusões**

567 O aumento na produção de raízes, maior quantidade e lignificação dos feixes
568 vasculares e a redução da área foliar, atrelada ao incremento nos teores de moléculas
569 osmorreguladoras, como carboidratos solúveis, demonstram ser importantes estratégias na
570 dinâmica de absorção de água do solo e na manutenção do conteúdo hídrico celular em
571 plantas de *Lippia gracilis* submetidas ao déficit hídrico moderado.

572 Processos metabólicos relacionados com a dissipação do excesso de energia, como a
573 ação dos carotenoides, aliado a eficiência do sistema antioxidativo enzimático, proporcionam
574 a conservação das estruturas celulares, acarretando na rápida recuperação da turgescência
575 celular no período de reidratação e, posteriormente, recuperação dos parâmetros fisiológicos
576 e de crescimento, sendo essas, importantes estratégias de sobrevivência adotadas por *Lippia*
577 *gracilis* frente ao déficit hídrico imposto.

578

579 **Agradecimentos**

580 Agradecemos a Universidade Federal Rural de Pernambuco, em particular a equipe do
581 Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) pela ajuda direta e indireta na realização
582 desse trabalho. Agradecemos, também, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
583 e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudos do
584 primeiro autor.

585

586

587

588

589

590

591 **Referências**

- 592 Afzal, A.; Gulzar, I.; Shahbaz, M.; Ashraf, M., 2014. Water deficit-induced regulation of
593 growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, inorganic nutrient accumulation and
594 antioxidative defense mechanism in mungbean [*Vigna radiata* (L.)Wilczek]. J. Appl. Bot.
595 Food Qual. 87, 147 – 156.
- 596 Ajithkumar, I.P., Panneerselvam, R., 2014. ROS scavenging system, osmotic maintenance,
597 pigment and growth status of *Panicum sumatrense* roth. under drought stress. Cell Biochem.
598 Biophys. 68, 587–595.
- 599 Anjum, S. A.; Xiel, X.; Wangl, L.; Saleem, F.; Manl, C.; Leil, W., 2011. Morphological,
600 physiological and biochemical responses of plants to drought stress. Afr. J. Agric. Res. 6,
601 2026-2032. Doi: 10.5897/AJAR10.027
- 602 Aou-ouad, H.E., López, R., Venturas, M., Martorell, S., Medrano, H., Gulías, J., 2017. Low
603 resistance to cavitation and xylem anatomy partly explain the decrease in the endemic
604 *Rhamnus ludovici-salvatoris*. Flora. 229, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.01.005>
- 605 Aranda, I. , Cano, F. J., Gascó, A., Cochard, H., Nardini, A., Mancha, J. A, López, R.;
606 Sánchez-Gómez, D., 2015. Variation in photosynthetic performance and hydraulic architecture
607 across European beech (*Fagus sylvatica* L.) populations supports the case for local adaptation
608 to water stress. Tree Physiol. 35, 34-46. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu101>
- 609 Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to
610 transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of
611 wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. Physiol. Plant. 280–292.
612 Doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.x
- 613 Barbosa, M.R., Silva, M.M.A., Willadino, L., Ulisses, C., Camara, T.R., 2014. Geração e
614 desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. enzimática de espécies
615 reativas de oxigênio em plantas. Ciência Rural. 44, 453-460.
- 616 Bezerra Neto, E., Barreto, L.B., 2011. Análises químicas e bioquímicas em plantas. Editora
617 Universitária da UFRPE, 267p.
- 618 Bitu, V.C.N., Costa, J. G. M, Rodrigues, F. F. G., Colares, A. V., Coutinho, H. D. M., Botelho,
619 M. A., 2015. Effect of Collection Time on Composition of Essential Oil of *Lippia gracilis*

- 620 Schauer (Verbenaceae) Growing in Northeast Brazil. J. Essent. Oil Bear. Pl. Jeop. 647-653.
621 <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935043>
- 622 Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram
623 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-
624 254.
- 625 Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. Mikrokosmos 61:
626 255.
- 627 Cavatte, P.C., Oliveira, A. A. G., Morais, L. E., Martins, S. C. V., Sanglard, L.M.V.P.,
628 DaMatta, F. M., 2012. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee: a
629 morphophysiological analysis. Physiol. Plant. 144, 111-122. Doi: 10.1111/j.1399-
630 3054.2011.01525.x
- 631 Cerqueira, R.C., Costa, J.M., Chaves, M.M., Rodrigues, J.D., 2015. Fisiologia e metabolismo
632 foliar em duas variedades de videira sujeitas a um ciclo de déficit hídrico e reidratação. Agrária
633 – Rev. Bras. Ciênc. Agrá. 10, 211-217.
- 634 Chartzoulakis, K., Patakas, G., Kofidis, G., Bosabalidis, A., Nastou, A. (2002). Water stress
635 affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. Sci.
636 Hortic., 95, pp. 39-50. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00016-X)
- 637 Cruz, E. M. O., Pinto, J. A. O., Fontes, S. S., Arrigoni-Blanck, M. F., Bacci, L., De Jesus, H.
638 C. R., Santos, D. A., Alves, P. B., Blank, A. F., 2014. Water Deficit and Seasonality Study on
639 Essential Oil Constituents of *Lippia gracilis* Schauer Germplasm. Sci. World J. 2014, 1-9.
640 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/314626>
- 641 Das, K., Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of
642 antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. Front. Environ. Sci. 2,
643 1–13. Doi:10.3389/fenvs.2014.00053
- 644 Dianat, M., Saharkhiz, M. J., Tavassolian, I. 2016. Salicylic acid mitigates drought stress in
645 *Lippia citriodora* L.: Effects on biochemical traits and essential oil yield. Bioc. Agri.
646 Biotechnol. 8, 286-293. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.010>

- 647 Dominghetti, A. W., Souza, A. J. J., Silveira, H. R. O., Sant'Ana, J. A. V., Souza, K. R. D.,
648 Guimarães, R. J., Lacerda, J. R., 2016. Tolerância ao déficit hídrico de Cafeeiros produzidos
649 pos estaquia e embriogênese somática. *Coffee Science*. 11, 117 – 126.
- 650 Du, H. , Wu, N., Chang, Y., Li, X., Xiao, J., Xiong, L., 2013. Carotenoid deficiency impairs
651 ABA and IAA biosynthesis and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Plant*
652 *Mol. Biol.* 83, 475–488.
- 653 Eisenhut, M., Bräutigam, A., Timm, S., Florian, A., Tohge, T., Fernie, A. R., Bauwe, H.,
654 Weber, A. P. M., 2017. Photorespiration Is Crucial for Dynamic Response of Photosynthetic
655 Metabolism and Stomatal Movement to Altered CO₂ Availability. *Molecular Plant*. 10, 47–61.
656 Doi:10.1016/j.molp.2016.09.011. 2017.
- 657 Fahn, A.; Cutler, D. A., 1992. *Xerophytes*, 1^o ed. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- 658 Ferraz, R.P.C., Bomfim, D. S., Carvalho, N. C., Soares, M. B. P., Silva, T. B., Machado, W. J.
659 Prata, A. P. N., Costa, E. V., Moraes, V. R. S., Nogueira, P. C. L., Bezerr, D. P., 2013.
660 Cytotoxic effect of leaf essential oil *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). *Phytomedicine*.
661 20, 615-621. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.01.015>
- 662 Ghotbi-Ravandi, A. A., Shahbazi, M., Shariati, M., Mulo, P., 2015. Effects of Mild and Severe
663 Drought Stress on Photosynthetic Efficiency in Tolerant and Susceptible Barley (*Hordeum*
664 *vulgare* L.) Genotypes. *J. Agro. Crop Sci.* 200, 403-415. Doi:10.1111/jac.12062. 2015.
- 665 Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants.
666 *Plant Physiol.* 59, 309 - 314.
- 667 Gill, S. S.; Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic
668 stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909 – 930.
669 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- 670 Gomes, S. V. F., Nogueira, P. C. L., Moraes, V. R. S., 2011. Aspectos químicos e biológicos
671 do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclat. Quim. J.* 36, 64-77.
- 672 Gorai, M.; Laajili, W.; Santiago, L. S.; Neffati, M. Rapid recovery of photosynthesis and water
673 relations following soil drying and re-watering is related to the adaptation of desert shrub
674 *Ephedra alata* subsp. *alenda* (Ephedraceae) to arid environments. *Environ. Exp. Bot.* 109,
675 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.08.011>

- 676 Havir E A, Mchale N A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple
677 forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 84, 450–455. Doi:10.1104/pp.84.2.450
- 678 Heath, R. L.; Packer L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. Kinetics and
679 stoichiometry of fatty acid peroxidation. – *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189-198.
- 680 Johansen D.A., 1940. *Plant micro technique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- 681 Lakra, N., Nutan, K.K., Das, P., Anwar, K., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A., 2015. A nuclear-
682 localized histone-gene binding protein from rice (OsHBP1b) functions in salinity and drought.
683 *Plant Physiol.* 176, 36–46. Doi:10.1016/j.jplph.2014.11.005.
- 684 Lima G. P., Souza, T. M., Freire, G. P., Farias, D. F., Cunha, A. P., Ricardo, N. M. P. S.,
685 Morais, S. M., Carvalho, A. F. U., 2013. Further insecticidal activities of essential oils from
686 *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *Parasitol Res.* 112, 1953–1958.
- 687 Lima Neto, M., Cunha, J.R., Federal, U., 2017. Cyclic electron flow, NPQ and
688 photorespiration are crucial for the establishment of young plants of *Ricinus* and *Jatropha*
689 *curcas* exposed to drought. *Plant Biol.* Doi:10.1111/ijlh.12426. 2017.
- 690 Lorenzi, H.; Matos, F.J.A., 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova
691 Odessa: Instituto Plantarum.
- 692 Loreto, F.; Velikova, V. 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic
693 apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of
694 cellular membranes. *Plant Physiol.* 127, 1781-1787.
- 695 Marinho, M.J.M.; Albuquerque, C.C.; Morais, M.B.; Souza, M.C.G.; Silva, K.M.B., 2011.
696 Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. *Rev. Bras.*
697 *Plant. Med.* 13, 246-252.
- 698 Marreto, R. N.; Almeida, E. E. C. V., Alves, P. B., Niculau, E. S., Nunes, R. S., Matos, C. R.
699 S., Araújo, A. A. S., 2008. Thermal analyses and gás chromatography coupled mass
700 spectrometry analyses of hidroxipropylmetry analyses of hidroxipropyl- β -cyclodextrin
701 inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. *Thermochimica Acta.* 475, 53-58.
702 <https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.06.015>
- 703 Melo J. O. 2013. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia*
704 *gracilis* Schauer genotypes. *Acta Trop.* 128, 110–115.

- 705 Ministério do Meio Ambiente. Caatinga, 2014. <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>.
- 706 Moraes, V. R. S., Thomasi, S. S., Sprenger, R. F., Prado, V. M. J., Cruz, E. M. O., Cass, Q. B.,
707 Ferreira, A. G., Blank, A. F., 2017. Secondary Metabolites from an Infusion of *Lippia gracilis*
708 Schauer Using the LC-DAD-SPE/NMR Hyphenation Technique. J. Braz. Chem. 28, 1335-
709 1340. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160299>
- 710 Nakano, Y.; Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific
711 peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22, 867-880.
- 712 Pinto, C.D.M., José, F., Fernandes, A., 2014. Relações hídricas, trocas gasosas em amendoim,
713 gergelim e mamona submetidos a ciclos de deficiência hídrica. Agropecuária Técnica. 35, 31–
714 40.
- 715 Pratt, R. B.; Jacobsen, A. L.; Ewers, F. W.; Davis, S. D., 2007. Relationships among xylem
716 transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the
717 California chaparral. New Phytologist. 174, 787-798. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02061.x
- 718 Roxana, E., Vignolo, F., Vos, D., 2014. Model Elevated CO₂ mitigates drought and
719 temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. Plant Science.
720 doi:10.1016/j.plantsci.2014.11.001. 2014.
- 721 Sabino, F. G. S., Cunha, M. C. L., Santana, G. M., 2016. Estrutura da vegetação em dois
722 fragmentos de caatinga antropizada na Paraíba. Floresta e Ambiente. ISSN 2179 - 8087
723 (online).
- 724 Santelia, D., Lawson, T., 2016. Rethinking Guard Cell Metabolism. Plant physiol. 172, 371–
725 1392. Doi:10.1104/pp.16.00767. 2016.
- 726 Santos, J. P.; Araújo, E. L.; Albuquerque, U. P., 2008. Richness and distribution of useful
727 woody plants in the semi-arid region of northeastern Brazil. J. Arid Environ. 72, 652 - 663.
728 <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2007.08.004>
- 729 Sass J.E., 1951. Botanical microtechnique. 2 ed. Ames, the Iowa State College Press.
- 730 Savchenko, T., Kolla, V.A., Wang C., Hicks, Z. N. D. R., Phadungchob, B., Chehab, W. E.,
731 Brandizzi, F., Froehlich, J., Dehesh, K., 2014. Functional Convergence of Oxylipin and
732 Abscisic Acid Pathways Controls Stomatal Closure in Response to Drought. Plant Physiol.
733 164, 1151-1160. <https://doi.org/10.1104/pp.113.234310>

- 734 Sewelam, N., Kazan, K., Schenk, P. M., 2016. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen
735 Species at the Cross-Road. *Front Plant Sci.* 7, 1-21. Doi: 10.3389/fpls.2016.00187
- 736 Silva, C.M.S., Harakava, R., Sonsin-Oliveira, J., Marcati, C. R., Machado, S. R., Ribeiro, R.
737 V., Habermann, G., 2017. Physiological and structural traits of the congeneric species *Styrax*
738 *ferrugineus* and *S. pohlii* occurring in contrasting environments. *Flora.* 235, 51–58.
739 <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.01.014>
- 740 Silva, P. A., Cosme, V. S., Rodrigues, K. C. B., Detmann, K. S. C., Leão, F. M., Cunha, R. L.,
741 Buselli, R. A. F., DaMatta, F. M., Pinheiro, H. A., 2017. Drought tolerance in two oil palm
742 hybrids as related to adjustments in carbon metabolism and vegetative growth. *Acta Physiol.*
743 *Plant.* 39-58. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2354-4>
- 744 Silva, V. N., Souto, L. S., Dutra Filho, J. A., Souza, T. M. A.; Borges, C. H. A., 2015.
745 Deposição de serapilheira em uma área de caatinga preservada no semiárido da Paraíba, Brasil.
746 *Revista Verde.* 10, 21 – 25.
- 747 Silva-Pinheiro, J., Lins, L., Souza, F. C., Silva, C. E. M., Moura, F. B. P., Endres, L., Justino,
748 G. C., 2016. Drought-stress tolerance in three semi-arid species used to recover logged áreas.
749 *Braz. J. Bot.* 39, 1031–1038.
- 750 Silveira, P. S., Custódio, J. P. C., Silva, F. C. M., Nascente, A. C. S., Monteiro, C. L., Matos,
751 F. S., 2016. A ação dos brassinosteróides no crescimento de mudas de pinhão manso sob
752 déficit hídrico. *Agri-Environmental Science.* 2, 52-61.
- 753 Shi, K., Li, X., Zhang, H., Zhang, G., Liu, Y., Zhou, Y., Xia, X., Chen, Z., Yu, J., 2015. Guard
754 cell hydrogen peroxide and nitric oxide mediate elevated CO₂ induced stomatal movement in
755 tomato. *New Phytol.*, 208, 342 – 353. Doi: 10.1111/nph.13621
- 756 Souza, A.V.V., Santos, U. S., Correa, R. M., Souza, D. D., Oliveira, F. J. V., 2017. Essential
757 Oil Content and Chemical Composition of *Lippia gracilis* Schauer Cultived in the Sub-meddle
758 São Francisco Valley. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 20, 983-994.
759 <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1377117>
- 760 Tatagiba, S. D., Pezzopane, J. E. M.; Reis, E. F., 2015. Fotossíntese em *Eucalyptus* sob
761 diferentes condições edafoclimáticas. *Eng. Agri.* 23, 336-345.
- 762 Tian, L., Xu, P., Chukhutsina, V. U., Holzwarth, A. R., Croce, R., 2016. Zeaxanthin-
763 dependent nonphotochemical quenching does not occur in photosystem I in the higher plant

- 764 *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, 4828-4832. Doi:
765 10.1073/pnas.1621051114
- 766 Torres-Ruiz, J. M.; Cochard, H.; Fonseca, E.; Badel, E.; Gazarini, L.; Vaz, M., 2017.
767 Differences in functional and xylem anatomical features allow *Cistus* species to co-occur and
768 cope differently with drought in the Mediterranean region. Tree Physiol. 37, 755–766.
769 <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx013>
- 770 Trevisan, M. T. S., Marques, R. A., Silva, M. G. V., Scherer, D., Haubner, R., Ulrich, C. M.,
771 Owen, R. W., 2016. Composition of Essential Oils and Ethanol Extracts of the Leaves of
772 *Lippia* Species: Identification, Quantitation and Antioxidant Capacity. Rec. Nat. Prod. 10, 485-
773 496.
- 774 Vieira, L.S., Sousa, R.S.; Lemos, J.R., 2015. Plantas medicinais conhecidas por especialistas
775 locais de uma comunidade rural maranhense. Rev. Bras. Plant. Med. 17, 1061-1068.
- 776 Voss, I., Sunil, B., Scheibe, R., Raghavendra, A.S., 2013. Emerging concept for the role of
777 photorespiration as an important part of abiotic stress response. Plant Biology. 15, 713–722.
778 Doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00710.x.
- 779 Wang, G.P., Hui, Z., Li, F., Zhao, M.R., Zhang, J.; Wang, W., 2010. Improvement of heat and
780 drought photosynthetic tolerance in wheat by overaccumulation of glycinebetaine. Plant
781 Biotechnol. 4, 213–222.
- 782 Yemm, E. W., Willis, A. J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extract by anthrone.
783 Biochem. J. 57, 508-514.
- 784 Yi, X., Zhang, Y., Yao, H., Luo, H., Gou, L., Chow, W. S., Zhang, W., 2016. Rapid recovery
785 of photosynthetic rate following soil water deficit and re-watering in cotton plants (*Gossypium*
786 *herbaceum* L.) is related to the stability of the photosystems. J. Plant Physiol. 194, 23-34.
787 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.016>
- 788 Zhang, C., Zhan, D.X., Luo, H.H., Zhang, Y.L., Zhang, W.F., 2016. Photorespiration and
789 photoinhibition in the bracts of cotton under water stress. Photosynthetica 54, 12–18.
790 Doi:10.1007/s11099-015-0139-9. 2016.