

Prolina livre e flavonoides totais de *Lippia origanoides* submetidos a níveis de saturação por base e estresse hídrico

Messulan Rodrigues Meira¹, Ernane Ronie Martins¹, Ivan Caldeira Almeida Alvarenga²

¹ Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros, MG, Brasil. E-mail: messulan.meira@gmail.com (ORCID: 0000.0003-2447-342X); ernane.ufmg@gmail.com (ORCID: 0000-0001-6139-7206)

² Prefeitura Municipal de Fundão, Secretaria de Agricultura, Fundão, ES, Brasil. E-mail: pytchouai@yahoo.com.br (ORCID: 0000-0001-9025-727X)

RESUMO: Objetivou-se avaliar o comportamento dos acessos de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) em diferentes níveis de saturação por base e estresse hídrico a partir dos teores de prolina livre, flavonoides totais e acúmulo de silício. O experimento consistiu de cinco acessos submetidos a níveis de saturação por base com agrossilício (0,92; 2,47; 4,0; 5,55 e 7,09 g de Si), cujas avaliações foram feitas durante a irrigação diária e sob suspensão hídrica de 10 dias. A prolina foi obtida por meio de ácido sulfosalicílico e ninhidrina ácida, o flavonoide foi a partir de extrato metanólico e cloreto de alumínio e o silício por meio de azul-de-molibdênio. As absorvâncias foram registradas em 520 nm para a prolina, 425 nm para flavonoides e 660 nm para silício. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão a 5 % de significância. A melhor saturação por bases entre os acessos variou entre 20 a 50%. Os acessos ICA-3 e ICA-4 foram os que apresentaram a melhor produção para as duas variáveis, com capacidade de acumular até $\pm 3,0 \mu\text{mol g}^{-1}$ de prolina livre na matéria fresca e até $\pm 250 \text{ mg RE g}^{-1}$ de flavonoide na matéria seca. O acesso ICA-3 apresentou maior acúmulo de silício nas folhas. Assim, a adição de $2,17 \text{ t ha}^{-1}$ de agrossilício em cultivo de *Lippia origanoides*, favorece a produção de metabolitos secundários sob estresse hídrico.

Palavras-chave: agrossilício; alecrim-pimenta; metabólito secundário; planta medicinal

Free proline and total flavonoids from *Lippia origanoides* submitted to base saturation levels and water stress

ABSTRACT: We aimed to evaluate the behavior of the accesses of rosemary pepper (*Lippia origanoides*) at different levels of saturation and water stress from the level of free proline, total flavonoids and silicon accumulation. The experiment consisted of accesses submitted to saturation levels with agrosilicon (0.92; 2.47; 4.0; 5.55 e 7.09 g of Si) which were evaluated during daily irrigation and after 10 days of water suspension. The amount of proline was obtained by means of sulfosalicylic acid and acid ninhydrin, the flavonoid contents was obtained by means of methanolic extract and aluminum chloride and the silicon contents by means of molybdenum blue. The absorbances were recorded at 520 nm for proline, 425 nm for flavonoid and 660 nm for silicon. The results were submitted to analysis of variance and regression. The best dose response of silicon between the accesses was of 20 to 50 %. The ICA-3 and ICA-4 were those that presented the best production for the two variables, with a capacity to accumulate up to $\pm 3.0 \mu\text{mol g}^{-1}$ of the proline in fresh matter and up to $\pm 250 \text{ RE g}^{-1}$ of flavonoids content in dry mass. ICA-3 access presented better silicon accumulation in leaves. Thus, the addition of 2.17 t ha^{-1} of agrosilicic in cultivation of *Lippia origanoides* favors the production of secondary metabolites under water stress.

Key words: agrosilicon; rosemary pepper; secondary metabolite; medicinal plant

Introdução

O estresse no vegetal pode ser influenciado por vários fatores abióticos, dentre eles destaca-se a limitação hídrica. A resposta fisiológica da planta ao estresse depende da intensidade e dos fatores genéticos (Karatat et al., 2014). Em situação de estresse moderado, pode induzir ajuste estomático, resultando na manutenção da turgescência celular (Monteiro et al., 2014). A planta em condições severas de estresse, favorece a formação de espécies reativas de oxigênio, que promovem reações adversas, levando à degradação dos pigmentos fotossintéticos, sistema de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (Bianchi et al., 2016).

Alguns metabólitos secundários são importantes na determinação do nível do estresse hídrico. A prolina é um aminoácido livre que atua na redução do potencial osmótico, tanto nas estruturas de membrana, aliviando as células dos efeitos negativos provocados pela escassez de água quanto nas funções de proteção da célula contra as espécies reativas de oxigênio (Borgo et al., 2016). Os flavonoides são uma classe de antioxidantes naturais com capacidade de sequestrar radicais livres e quelar íons metálicos e, assim como a prolina, protege os tecidos dos radicais livres e contra a peroxidação lipídica, por atuar como fontes de hidrogênio e, se oxidam no lugar do ácido graxo (Silva et al., 2015).

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre. Tem sua origem nos processos de intemperização dos minerais primários e secundários (Schleier et al., 2014). As escórias de siderurgia são as fontes mais abundantes e acessíveis de silício, elas são originárias da reação do calcário com a sílica sob altas temperaturas. Sua granulometria fina permite maior reatividade no solo, o que faz deste material ser bem consumido na agricultura para elevar o pH e evitar a perda de água por meio do fechamento dos estômatos (Teodoro et al., 2015).

Alecrim-pimenta, *Lippia origanoides* Kunth., é uma espécie arbustiva, aromática, nativa do norte da América do Sul e América Central, ocorre no nordeste brasileiro e está adaptada à regiões semi-áridas do norte de Minas Gerais. Esta espécie é produtora de flavonoides, quinonas, triterpenos, lignanas, esteroides livres e glicosilados, ácidos orgânicos e óleos essenciais cujos compostos químicos atuam em sinergismo na defesa química contra predadores e espécies patogênicas. Sendo bem reconhecidos pela sua eficiência antimicrobiana (Souza, 2015).

Com a demanda crescente por plantas medicinais, os aspectos técnicos de cultivo tornam-se cada dia mais importantes. Para estabelecer um cultivo comercial de plantas medicinais, é necessário atentar aos critérios técnicos quanto à irrigação e preparo do solo, sendo a escassez de água um fator limitante para este tipo de atividade, cujo insumo, dificulta o produtor em atender as necessidades do mercado. Além das condições hídricas, a fertilização também influencia significativamente no crescimento vegetal. Portanto a correção da acidez do solo é um dos fatores importantes neste processo, pois permite uma melhor absorção de nutrientes e

consequente produção. Embora seja comum o uso de escórias de siderurgia como fonte de Si para correção do pH do solo em ambientes secos para cultivo de espécies agrícola, ainda é desconhecido a sua atuação para essa finalidade em cultivo de plantas medicinais (Schleier et al., 2014).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar teores de prolina livre, flavonoides totais e acúmulo de silício em cinco acessos de alecrim-pimenta submetidos à níveis de saturação por base com agrossilício e estresse hídrico.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Regional de Montes Claros (ICA/UFMG). Localizado nas coordenadas geográficas: latitude 16°40'50,92"S e longitude 43°50'22,36"W, na altitude de 650 m. O experimento foi conduzido em casa de vegetação coberta com filme de polietileno de baixa densidade (150 µm de espessura) e laterais com Sombrite® de 50% de proteção solar. O experimento foi realizado entre o período 30 de setembro de 2016 a 20 de junho de 2017, totalizando 273 dias de cultivo. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5x2: cinco acessos, cinco concentrações de Si e duas condições de regime hídrico: plantas irrigadas (controle) e sob estresse hídrico. Os acessos de *Lippia origanoides* Khunt. (ICA-1; ICA-2; ICA3; ICA-4; ICA-5), são oriundas das regiões de Buenópolis, Serro, Glaucilândia e Montes Claros (Minas Gerais) e Guarapari (Espírito Santo), os quais são conservados *ex situ* no banco ativo de germoplasma do ICA/UFMG. As concentrações de Agrossilício® para vaso com capacidade em volume de 5 dm³ foram: 0,92; 2,47; 4,0; 5,55 e 7,09 g de Si por vaso. Esses valores foram correspondentes a 20, 30, 40, 50 e 60 % de saturação por base, com quatro repetições cada, totalizando 100 parcelas. A supressão hídrica foi de 10 dias sem irrigação e ocorreu aos 263 dias de cultivo, sendo que o tratamento controle permaneceu irrigado até os 273 dias.

Antes de proceder com os cálculos de calagem, realizou-se a caracterização química do solo, cuja análise apresentou as seguintes características: 14% de saturação por base; P (mg dm⁻³) = 0,15; K (mg dm⁻³) = 10; Ca²⁺(cmolc dm⁻³) = 0,20; Mg²⁺ (cmolc dm⁻³)= 0,10; H+Al³ (cmolc dm⁻³) = 2,08; T (cmolc dm⁻³) = 2,40; t (cmolc dm⁻³)=0,83 e pH (em H₂O) = 5,5, respectivamente. O P (Mehlich); K⁺(Mehlich); Ca²⁺ (KCl); H⁺+Al³ e Soma de bases, foram extraídos com acetato de cálcio 0,5 (mol/L) a pH 7; CTC, V e MO foram por digestão úmida Walkley-Black, conforme procedimento do Laboratório de Análise de Solos do ICA. De posse da análise do solo calculou-se a necessidade de calagem (NC. t ha⁻¹) por meio da Equação 1:

$$NC = \frac{T(V_f - V_i)}{PRNT} \times f \quad (1)$$

em que: (NC) = necessidade de calagem, (T) = capacidade de troca de cátion em pH 7, (V_f) = saturação por base desejada, (V_i) = saturação por base atual e (PRNT) = poder relativo de

neutralização total do calcário a ser utilizado em % e (f) = fator de correção para PRNT a 100% conforme recomendação da literatura Ageitec (Embrapa, 2017). Os valores obtidos foram convertidos em dm^3 para a capacidade do vaso de 5L.

O material vegetal foi obtido da propagação vegetativa por estaquia. As mudas foram transplantadas 30 dias após correção do solo sob irrigação diária com água destilada. A irrigação foi mantida em todos os vasos até o momento da suspensão hídrica. Também se procedeu quinzenalmente a adubação com 5 g de NPK na formulação 4-14-8.

O material coletado para as análises de prolina e flavonóides totais foram folhas completamente expandidas do terço médio do caule. As folhas coletadas foram colocadas em sacos plásticos identificadas e acondicionadas em ultrafreezer $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises.

A quantificação de prolina foi realizada de acordo a metodologia adotada por Dianat et al. (2016), com algumas modificações. Brevemente, 0,5 g de matéria fresca foi macerada, homogeneizada em 10 mL de ácido sulfossalicílico 3% (v/v), sendo posteriormente centrifugadas à 3000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 500 μL solução de extração contendo 1,5 mL de solução de ninhidrina ácida e 1,5 mL de ácido acético glacial p.a.. Para o preparo da ninhidrina ácida adicionou-se 150 mL de ácido acético, 100 mL de ácido fosfórico 6 M e 6,25 g de ninhidrina (v/v). As amostras foram incubadas em banho Maria a $100\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h. Após resfriamento, à reação foram adicionados 4 mL de tolueno, seguindo de agitação por 20s para a completa extração da prolina. O sobrenadante contendo os cromóforos provenientes da reação (sobrenadante vermelho brilhante) foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro a 520 nm. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol g}$ de massa fresca, baseado na curva de calibração do padrão de prolina a 1 mM Sigma Aldrich®.

A análise de flavonoides seguiu a descrita por Santos & Blatt (1998), com adaptações. Os teores de flavonoides foram quantificados a partir do extrato metanólico a 70% sob agitador orbital por 24 h, a partir de 0,25 g de material vegetal seco em estufa de circulação forçada a temperatura de $45\text{ }^\circ\text{C}$ por 72hs. Em 200 μL , foi adicionado 1,8 mL de metanol 70% e 130 μL de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 5%. O branco foi obtido a partir da solução metanólica de cloreto de alumínio (50%) sem a amostra (v/v). As reações e o branco foram agitados em vórtex e mantidas em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz. O conteúdo de flavonoides total foi determinado usando uma curva de calibração do padrão de rutina (Sigma Aldrich®) em 5 concentrações (0,1; 0,2, 0,4; 0,6; 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O ajuste da equação foi obtido a partir do coeficiente de determinação $R^2 = 0,9676$. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro UV visível, a 425 nm. O conteúdo total de flavonoides foi expresso como mg de rutina equivalentes por grama de extrato seco de alecrim-pimenta (mg RE g^{-1}). Após 10 dias de suspensão da irrigação, repetiu-se as análises de teores de prolina e flavonoide e realizou-se análise de teor de silício nas folhas e nas raízes.

A determinação de silício (Si) foi feita com base no método colorimétrico do azul-de-molibdênio proposto por Sebastian et al. (2013). Nesta etapa utilizou-se 100 mg de folhas e raízes desidratadas e pulverizadas, posteriormente calcinadas a $500\text{ }^\circ\text{C}$ por 6 h e resfriadas. Os cadinhos contendo as amostras tiveram seu peso aferido antes e depois de obter o peso da cinza total. Neste material, adicionou-se 1 mL de hidróxido de sódio da solução a 10%. O material foi novamente calcinado e resfriado, em que a temperatura e período da incineração foram os mesmos do padrão para todas as etapas. Na sequência, o material foi dissolvido em 10 mL de água destilada. Desta solução, alíquota de 2 mL foi transferida à balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada. Após homogeneização, transferiu-se 10 mL para outro balão volumétrico, onde adicionou 15 mL de água destilada, 1 mL da solução de ácido sulfúrico a 5N e 2 mL de solução de molibdato de amônio, na qual foi mantida em repouso por 5 minutos.

Na sequência, adicionou-se sob agitação rotativa na ordem os seguintes reativos: 1 mL de solução de ácido oxálico a 10%, 3 mL de solução de ácido sulfúrico (5N) e 1 mL de solução de ácido ascórbico a 2%. Após completar o volume com água destilada e decorridos 15 minutos após adição do último reativo, procedeu-se a leitura. A absorbância da leitura foi realizada no espectrofotômetro a 660 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 4 mL. A solução padrão de SiO_2 p.a. (Sigma Aldrich®) foi utilizada para a obtenção da curva de calibração. O teor de silício de cada amostra foi calculado a partir do ajuste da equação e, os valores de Si foram expressos em g kg^{-1} de matéria seca de folhas e raízes, respectivamente.

Os dados foram transformados em $\arcsen(\sqrt{x+1})/100$ e submetidos ao teste de homogeneidade (Bartlett), à análise de variância e posteriormente ao teste de Tukey ($p \leq 0,5$). A fim de obter informações do acúmulo de metabólitos em função dos níveis de saturação por base com agrossilício, as médias significativas foram submetidas à análise de regressão a 5 % de significância. Todo procedimento estatístico foi realizado pelo programa SAEG, versão 9.1 (Funarbe, 2017).

Resultados e Discussão

Os resultados apresentaram teores de prolina e flavonoides significativos em resposta à suspensão hídrica e níveis de saturação por base (Figura 1). Os teores durante o experimento em constante irrigação, foram baixos em relação aos teores sob estresse hídrico. Durante a irrigação, o Si, apresentou resposta uniforme em todos os tratamentos. Enquanto que, sob o estresse, os valores para os dois metabólitos avaliados aumentaram significativamente. A média total de prolina livre com irrigação foi de 0,39 $\mu\text{mol g}$ e após estresse foi de 2,45 $\mu\text{mol g}$ de massa fresca (Figura 1). O mesmo foi observado para flavonoides, em que sob irrigação, a média foi de 92,47 mg RE g^{-1} e aumentou para 252,57 mg RE g^{-1} após o estresse. Em relação ao acúmulo de silício, houve baixos teores bioacumulados nas folhas e raízes da *L. origanoides*. Os teores variam de 0,01 a 0,9 g kg^{-1} entre os órgãos dos acessos avaliados, folha e raiz.

Os teores de prolina nos acessos ICA-1, ICA-3 e ICA-4 apresentaram os menores ajustes de equação em plena irrigação, mostrando baixo acúmulo, cujas médias não diferiram estatisticamente, as quais apresentaram baixo coeficiente de determinação ($R^2=0,14^{ns}$; $0,13^{ns}$ e $0,29^{ns}$) (Figura 1). Já os acessos que apresentaram respostas significativas foram ICA-2 e ICA-5 com $R^2= 0,85^{**}$ e $0,98^{**}$. Em todos os tratamentos houve uma tendência em diminuir o teor de prolina com o aumento da saturação com Si. Com exceção do ICA-1 e ICA-3, que não apresentaram diferença entre o teor de prolina e a dose de Si, os demais acessos apresentaram o controle com o maior valor observado.

Quanto à suspensão hídrica (linha pontilhada), a média de prolina acumulada entre os acessos em ordem crescente foi: ICA-1 = 1,68, ICA-2 e ICA-5 = 2,0, ICA-3 e ICA-4 = 3,0 respectivamente. Esses dois últimos acessos foram

considerados os melhores adaptados ao estresse hídrico para as condições de cultivo, pois além de apresentarem o maior acúmulo, também apresentaram os melhores coeficientes de determinação, $R^2=0,72^{**}$.

Quanto ao nível de saturação por base, no ICA-1, houve um aumento de acúmulo na saturação a 40% com tendência a reduzir o teor à medida que elevou a saturação, sendo que no nível 60%, apresentou o menor teor (ICA-1 = $1,86 \mu\text{mol g}^{-1}$). O acesso ICA-2 apresentou comportamento diferente, em que os maiores teores foram no controle e na maior saturação (60% = $2,1 \mu\text{mol g}^{-1}$). O comportamento desse acesso foi semelhante ao ICA-5. Para esses acessos, ICA-2 e ICA-5, os teores foram os mesmos nos níveis de saturação em 30 e 40%, com $2,0 \mu\text{mol g}^{-1}$, tendendo a diminuir à medida que aumentou o nível de saturação. Já os acessos ICA-3 e ICA-4, mantiveram os mesmos teores do controle até o nível de 50%, com $3,19 \mu\text{mol g}^{-1}$, em

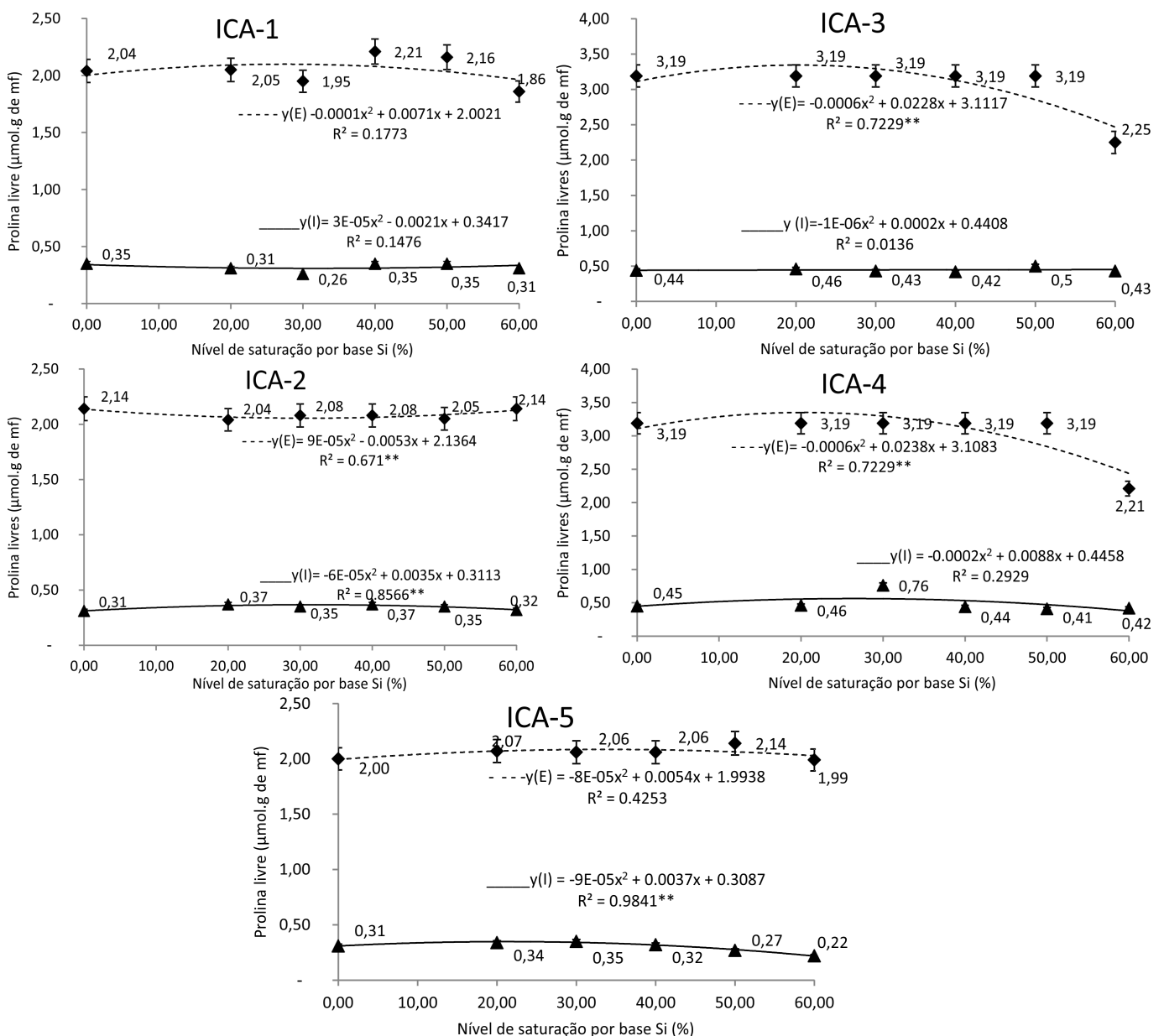


Figura 1. Teor de prolina livre na folha de cinco acessos de *Lippia origanoides* Kunth. submetidas a níveis de saturação por base com agrossilício em casa de vegetação. Linha contínua: com irrigação (I); linha pontilhada: estresse hídrico (E).

que também reduziram o acúmulo de prolina no maior nível de saturação aplicado.

Este resultado corrobora com o encontrado por Alvarenga et al., (2011), que reportaram acúmulo de $3,24 \mu\text{mol g}^{-1}$ de prolina livre aos 8 dias de supressão hídrica em plantas cultivadas a pleno sol. Segundo os autores, este teor foi estimulado linearmente até o oitavo dia de estresse. Se comparar o resultado reportado pelos autores com o período de estresse do presente estudo, de 10 dias, o teor de prolina manteve seu percentual por até 2 dias a mais em condições de casa de vegetação. Portanto, este resultado mostra que independente do tipo de cultivo, a *Lippia organoides* possui variedades com a capacidade de acumular até $\pm 3,0 \mu\text{mol g}^{-1}$ de prolina livre na matéria fresca.

Ao comparar o teor de prolina com *Lippia citriodora*, mantidas a 25% da capacidade de campo, combinado a 300 mg L^{-1} de ácido salicílico, Dianat et al. (2016) observaram baixos teores de prolina entre $0,20$ a $0,25 \mu\text{mol g}^{-1}$ de massa fresca. Segundo os autores, mesmo baixo, para a espécie, este valor é uma resposta da planta submetida ao estresse hídrico e ácido salicílico, que desempenha funções fisiológicas análogas ao silício. Enquanto que a *Lippia gracillis* submetida às concentrações crescente de NaCl ($0,25$ a 100 mM), aumentou o teor de prolina de $1,03$ na planta controle para $7,56 \text{ mg g}^{-1}$ de prolina de massa fresca aos 40 dias após estresse, não diferindo entre as concentrações (Ragagnin et al., 2014). O baixo teor de prolina na espécie estudada em relação às espécies aromáticas acima mencionadas pode ser devido à especificidade de metabólitos secundários em resposta fisiológica como mecanismo químico de defesa de cada espécie. No caso do alecrim-pimenta, o metabólito secundário principal é o carvacrol e timol, compostos químicos presentes nos óleos essenciais, cujo óleo, alcança média de $2,02 \text{ mL g}^{-1}$ em período seco (Ribeiro et al., 2016). Este fato explica a razão deste teor de prolina para a planta, pois, ainda que este seja um aminoácido livre acumulado em resposta passiva ao estresse, nesta espécie é produzido em menores quantidades. Os resultados deste estudo mostraram que é possível cultivar plantas medicinais com baixa disponibilidade hídrica, uma vez que a qualidade do produto, independe da escassez de água, sendo mais sensível às variações na temperatura (Ragagnin et al., 2014; Ribeiro et al., 2016).

Quanto aos flavonoides, todos os tratamentos em plena capacidade de campo, apresentaram comportamento quadrático significativo, com R^2 superior a $0,90^*$. O teor de flavonoides totais produzidos nos níveis 20, 30 40 e 50 % de saturação por base apresentaram o mesmo comportamento para todos os acessos com o menor teor de flavonoides totais apresentado para os tratamentos com 60% de saturação. Nos acessos ICA-2, ICA-3 e ICA-4, o nível de 50% de saturação apresentou maior teor de flavonoide ($98,67$; $105,42$; $104,69 \text{ mg RE g}^{-1}$). Enquanto que os acessos ICA-1 e ICA-5, os maiores teores foram no grupo controle ($89,66$ e $88,42 \text{ mg RE g}^{-1}$). Esta diferença é apresentada na Figura 2, mostrando uma redução nos teores de flavonoide desses acessos na presença de Si.

Nas plantas submetidas ao estresse hídrico, observou-se uma variação dos flavonoides de $217,07$ a $308,53 \text{ mg RE g}^{-1}$. A

produção de flavonoide foi correspondente ao teor de prolina para os mesmos tratamentos. As maiores médias foram observadas nos acessos ICA-3 e ICA-4 ($285,81$ e $288,54 \text{ mg RE g}^{-1}$ de mf) e as menores médias, representadas pelos melhores ajustes da equação, foram observadas nos acessos ICA-1 e ICA-5 ($217,07 \text{ mg RE g}^{-1}$) com $R^2= 0,79^*$ e $0,92^*$.

Quanto ao comportamento, os acessos ICA-2 e ICA-5 apresentaram semelhantes, onde o comportamento quadrático negativo mostrou que o maior nível de saturação por base (60%) apresentou valor de flavonoide inferior ao controle. Além dessa observação, esses dois acessos apresentaram tendência na redução dos teores de flavonóides nos níveis mais baixo de Si. Embora não tenha apresentado diferenças entre as concentrações de Si, observou-se que no nível de saturação de 50%, obteve maiores valores de flavonóides em todos os acessos, com exceção do acesso ICA-5, em que os teores mantiveram-se constantes em todos os níveis de saturação por base, com 217 mg RE g^{-1} e, neste acesso, apenas o controle apresentou o maior teor (240 mg RE g^{-1}) (Figura 2).

Os resultados apresentados são parecidos com os encontrados por Souza (2015) em estudo de sazonalidade em oito acessos da espécie, que registrou o mesmo comportamento para o ICA-3 e ICA-4 com média de $280,7 \text{ mg RE g}^{-1}$ e para o ICA-1, média de $230,4 \text{ mg RE g}^{-1}$. Além dos acessos ICA-1, ICA-3 e ICA-4, a autora avaliou outros diferentes deste do estudo e registrou uma variação no teor de flavonoide entre $114,69$ a $417,04 \text{ mg RE g}^{-1}$ de matéria seca. Os teores observados são considerados suficientes para conferir atividade antioxidante, atribuída à capacidade redutora do grupo fenólico e produtora do radical fenoxila (Taiz & Zeiger, 2013).

Estudo com a espécie *L. sidoides* submetida a oito dias de supressão hídrica, em pleno sol, apresentam baixa produção deste metabólito, que variou entre $0,0139$ a $0,008 \text{ g g}^{-1}$ (Alvarenga et al., 2011). Isso mostra que os teores de prolina e flavonoides variam entre os acessos e o trato cultural, uma vez que, em condições de supressão de irrigação em pleno sol, o estímulo para acúmulo de prolina livre é proporcional ao decréscimo no teor de flavonoides totais (Alvarenga et al., 2011). Todavia, o cultivo de alecrim-pimenta em casa de vegetação, aplicando agrossilício como corretivo do solo, favorece a produção de flavonoides totais.

Onde no acesso ICA-1, a melhor resposta para prolina foi no nível de 40% de saturação por base. No acesso ICA-2 não houve diferença entre os níveis de saturação e o controle para a prolina, mas para os teores de flavonoides, este acesso (ICA-2) apresentou maior teor no maior nível (60%) de saturação por base. Os acessos ICA-3, ICA-4 e ICA-5, apresentaram acúmulo de prolina constante entre o controle até o nível de 50%, enquanto que para flavonoides, neste mesmo nível (50%) também houve os maiores teores, com exceção do acesso ICA-5 que obteve maior teor no controle.

Quanto ao acúmulo de silício na forma de SiO_2 , nas folhas, o acesso ICA-3 apresentou a melhor média, com acúmulo no nível de 40% de saturação de Si com $0,9 \text{ kg kg}^{-1}$ de SiO_2 . Para as raízes, os acessos ICA-3 e ICA-5, apresentaram médias baixas e uniformes.

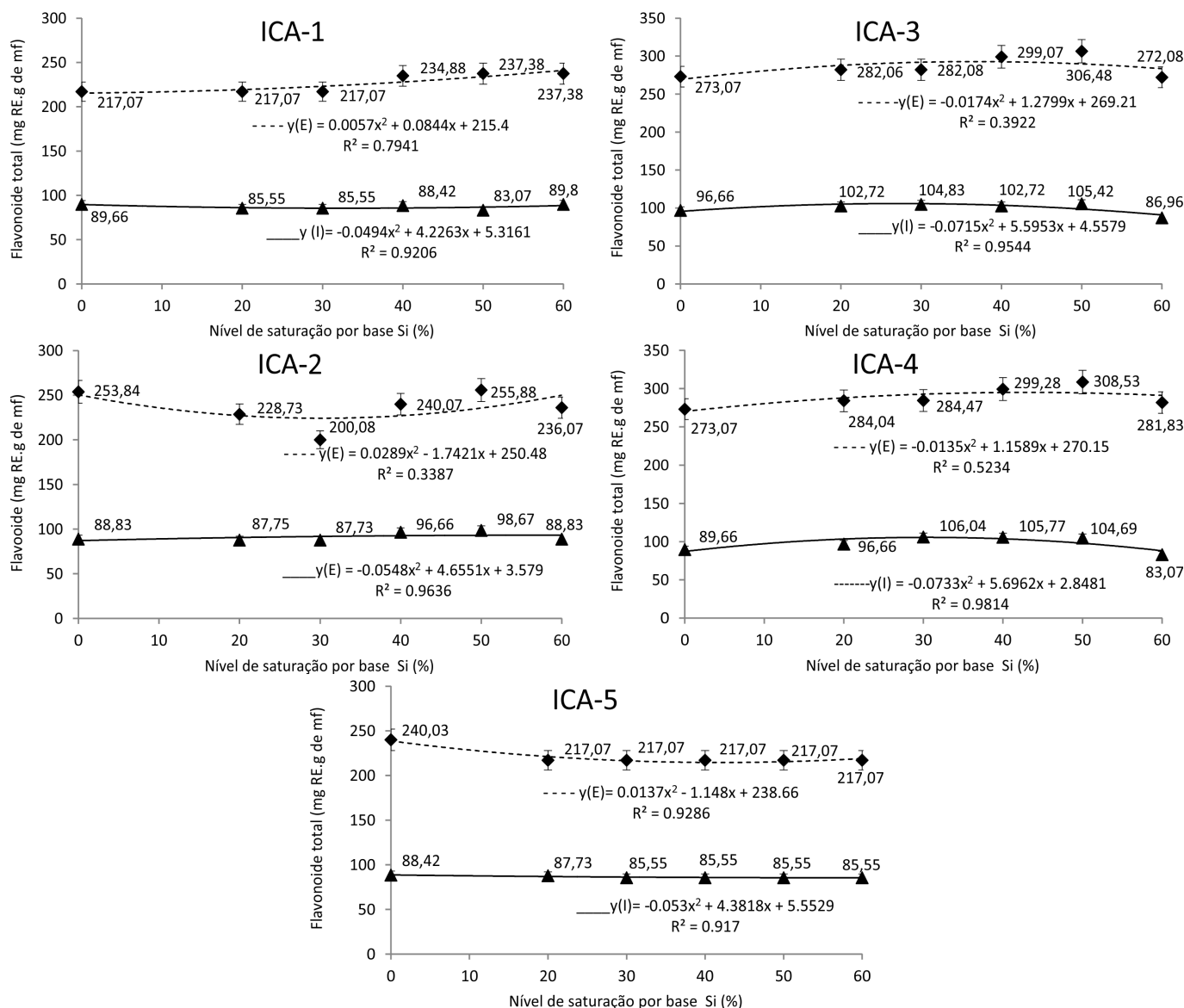


Figura 2. Teor de flavonoides totais na folha de cinco acessos de *Lippia origanoides* Kunth. submetidas a níveis de saturação por base com agrossilício em casa de vegetação, Linha contínua: com irrigação (I); linha pontilhada: estresse hídrico (E).

O melhor resultado foi obtido nos acessos ICA-1 e ICA-4 nos níveis de saturação 30 e 60% , com 0,6 g kg⁻¹ de SiO₂. O acúmulo de SiO₂ nas raízes dos acessos ICA-2 e ICA-4 apresentaram médias inversamente proporcionais. No ICA-2, houve redução do acúmulo na maior concentração, enquanto que no ICA-4, o acúmulo foi proporcional à maior saturação por base (Figura 3).

Os resultados apresentados estão de acordo Almeida et al. (2003) que reportaram teores de sílica entre 0,05 a 0,65 g kg⁻¹ para a espécie e, em outras nove espécies medicinais, os teores foram entre 0,05 a 0,62 g kg⁻¹, estes valores são considerados baixos. Para a adubação silicatada de algodão infestado por *Ramularia areola*, fungo patogênico, e ameixa infestada com bacterioses, houve redução da infestação a medida que aumentou o acúmulo de Si nas folhas (Curvelo et al., 2013; Ferreira et al., 2013). Não obstante, o silício tem esta função de melhorar a resitência à doenças e diminuir a severidade do ataque de microrganismos (Schleier et al., 2014), conferindo às plantas melhor capacidade fotossintética

tornando-as mais vigorosas com melhoria no rendimento de massa seca (Sá et al., 2015).

Em espécies que acumulam pouco Si, a distribuição nas folhas e raízes é uniforme, conforme observado no ICA-5 (Figura 3). Nas plantas acumuladoras, a maior concentração é nas células epidérmicas das folhas, podendo ser influenciada pela adubação nitrogenada (Mauad et al., 2013). Para ser considerada uma espécie acumuladora, ela precisa apresentar valores superiores a 1%, para não acumuladora, teor menor que 0,5%. Porém as plantas diferem na sua capacidade de absorção, onde genótipos diferentes podem apresentar concentrações de Si em órgãos distintos. Esse fato foi evidenciado no alecrim-pimenta pois, embora tenha apresentado valores inferiores a 1%, a espécie mostrou diferença entre os acessos, tanto na concentração acumulada, quanto no órgão.

Os resultados desta pesquisa indicam que a prolina e os flavonoides são metabólitos que podem ser produzidos em

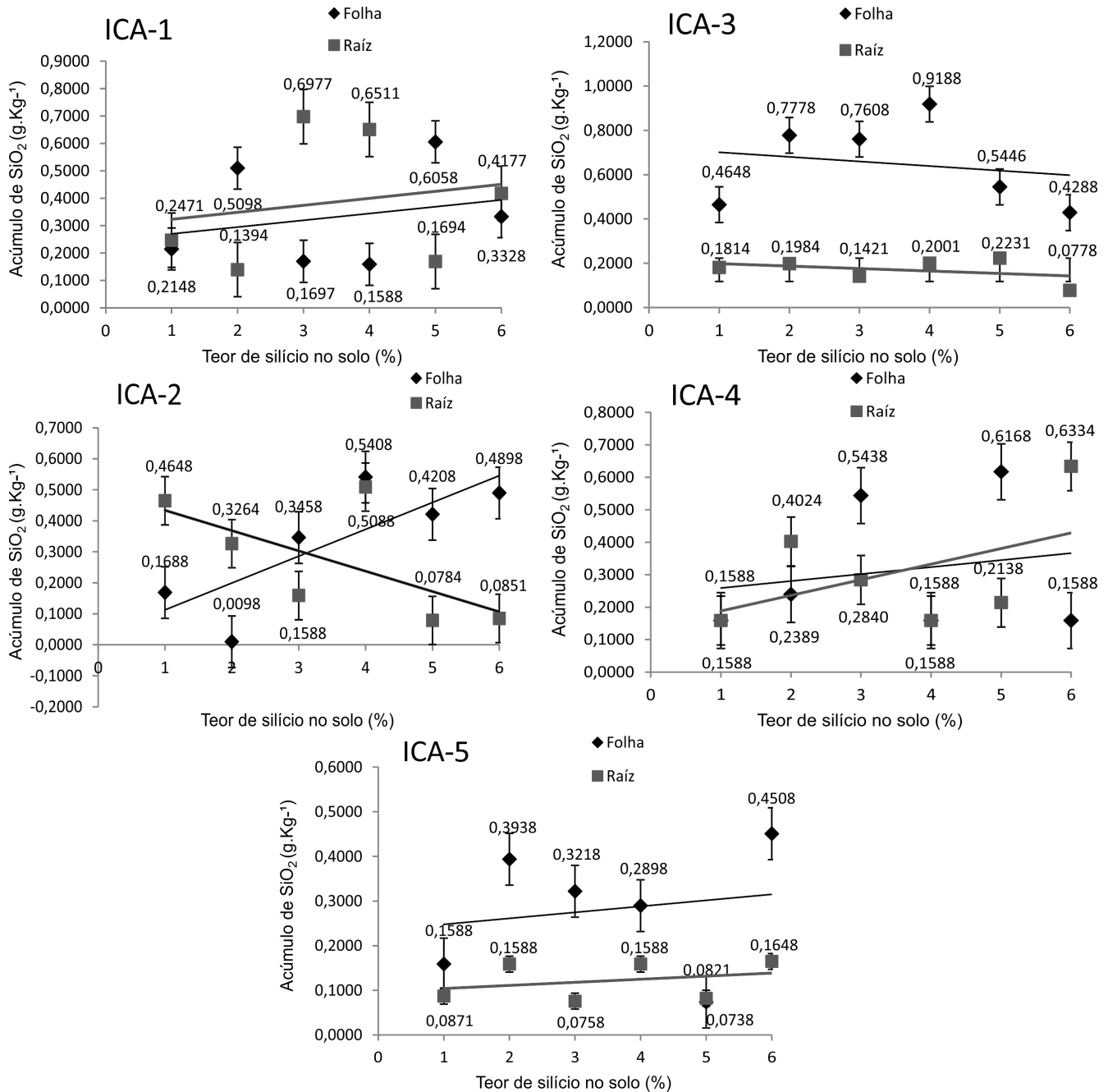


Figura 3. Acúmulo médio de Silício nas folhas e raízes de cinco acessos de *Lippia origanoides* Kunth, submetidas a níveis de saturação por base com agrossilício em casa de vegetação.

resposta ao estresse hídrico. O baixo acúmulo de silício das folhas e raízes na maioria dos acessos, sugere que a espécie pode ser do tipo não acumuladora de Si (Figuras 1, 2 e 3). Dessa forma, os resultados apresentados mostram que a produção de um determinado metabólito em resposta ao estresse hídrico é um fenômeno espécie-específica em que a aplicação de Si, pode melhorar a produção dos metabólitos de interesse e preservar o DNA para algumas espécies ou prejudicar a integridade de outras (Costa et al., 2016). É importante salientar que a função do Si no vegetal depende de fatores abióticos, bióticos e genéticos (Karatas et al., 2014; Dianat et al., 2016). Pode-se então atribuir as variações observadas dos teores de Si ao fator genético (Giongo & Bohnen 2011).

Esta relação genotípica é evidenciada nos acessos ICA-3 e ICA-4, onde o primeiro apresentou as maiores médias de Si acumulada nas folhas e prolina sob estresse hídrico e juntamente com o segundo, apresentaram os melhores teores de flavonoides independente da irrigação. Esse fato pode ser explicado pela expressão dos mesmos genes responsáveis pela tolerância ao estresse hídrico, uma vez que ambos apresentam proximidade geográfica. O que faz deles melhores adaptados para as condições ambientais da região.

Diante dos resultados apresentados, para melhor silificação das paredes celulares de *Lippia origanoides*, recomenda-se adição de agrossilício em cultivo nos níveis de saturação por base entre 20 a 50% (0,36 a 2,17 t ha⁻¹), pois doses superiores

tendem a reduzir o vigor das plantas bem como o teor de prolina e flavonoides.

Conclusão

Os acessos de *L. origanoides* apresentaram maior acúmulo de prolina e flavonoides nas condições de limitação hídrica, o que indica uma adaptação da espécie a condições de estresse hídrico. Foi observado que os acessos ICA-3 e ICA-4, apresentaram maiores produções desses metabólitos.

A espécie *L. origanoides* não é acumuladora de Si, pois apresenta baixos teores desse elemento nas folhas e raízes. Além disso, foi observado que houve variação influenciada pelos genótipos e dentre os acessos avaliados, o ICA-3 foi o que apresentou maior acúmulo de silício.

A saturação por bases influenciou significativamente a produção de prolina e flavonoides de diferentes acessos de *Lippia origanoides*, sendo recomendados níveis de saturação por bases entre 20 e 50%, utilizando agrosilício.

Literatura Citada

- Almeida, M.M.B.; Lopes, M.F.; Sousa, P.H.M.; Nogueira, C.M. Determinação de umidade, fibras, lipídios, cinzas e sílica em plantas medicinais. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v.21, n.2, p.343-350, 2003.
- Alvarenga, I.C.A.; Queiroz, G.A.; Honório, I.C.G.; Valadares, R.V.; Martins, E.R. Free proline in *Lippia sidoides* Cham. under water stress before harvest. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.13, suplemento especial, p.539-541, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000500006>.
- Bianchi, L.; Germino, G.H.; Silva, M.A. Adaptação das plantas ao déficit hídrico, Acta Iguazu, v.5, n.4, p.15-32, 2016. <http://e-revista.unioeste.br/index.php/actaiguazu/article/view/16006/10892>. 05 Nov. 2017.
- Borgo, L.; Maur, C.J.; Vieira, L.G.E. Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants. Acta Scientiarum. Agronomy, v.37, n.2, p.191-199, 2015. <https://doi.org/10.4025/actasciagr.v37i2.19>.
- Costa, B.N.S.; Dias, G.D.M.G.; Costa, I.D.J.S.; Assis, F.A.; Silveira, F.A.; Pasqual, M. Effects of silicon on the growth and genetic stability of passion fruit. Acta Scientiarum. Agronomy, v.38, n.4, p.503-511, 2016. <https://doi.org/10.4025/actasciagr.v38i4.30939>.
- Curvêlo, C.R.S.; Rodrigues, F.A.; Pereira, L.F.; Silva, L.C.; Damatta, F.M.; Berger, P.G. Trocas gasosas e stress oxidativo em plantas de algodoeiro supridas com silício e infectadas por *Ramularia aréola*. Bragantia, v.72, n.4, p.346-359, 2013. <https://doi.org/10.1590/brag.2013.053>.
- Dianat, M.; Saharkhiz, M.J.; Tavassolian, I. Salicylic acid mitigates drought stress in *Lippia citriodora* L.: Effects on biochemical traits and essential oil yield. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v.8, p.286-293, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.010>.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. Agência Embrapa de Informações Tecnológica - Ageitec. Árvore do conhecimento Soja. http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_37_271020069132.html. 20 Nov. 2017.
- Ferreira, S.G.M.; Botelho, R.V.; Faria, C.M.D.R.; Mateus, M.A.F.; Zaluski, W.L. Development and fitossanitary on plum trees treated with silicon in organic system. Revista Brasileira de Fruticultura, v.35, n.4, p.1059-1065, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000400017>.
- Fundação Arthur Bernardes da Universidade Federal de Viçosa – Funarbe. Sistema para análise estatística – SAEG. Versão 9.1. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes da Universidade Federal de Viçosa, 2017. <http://arquivo.ufv.br/saeg>. 30 Ago. 2017.
- Giongo, V.; Bohnen, H. Relação entre alumínio e silício em genótipos de milho resistente e sensível a toxidez de alumínio. Bioscience Journal, v.27, n.3, p.348-356, 2011. <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7386/7549>. 05 Nov. 2017.
- Karatas, I.; Ozturk, L.; Demir, Y.; Unlukara, A.; Kurunc, A.; Duzdemir, O. Alterations in antioxidant enzyme activities and proline content in pea leaves under long-term drought stress. Toxicology and Industrial Health, v.30, n.8, p.693-700, 2014. <https://doi.org/10.1177/0748233712462471>.
- Mauad, M.; Costa, C.A.; Crusciol, H.G.F.; Machado, S.R. Deposição de sílica e teor de nitrogênio e silício em arroz. Semina: Ciências Agrárias, v.34, n.4, p.1653-1662, 2013. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n4p1653>.
- Monteiro, J.G.; Cruz, F.J.R.; Nardin, M.B.; Santos, D.M.M. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.49, n.1, p.18-25, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000100003>.
- Ragagnin, R.C.G.; Albuquerque, C.C.; Oliveira, F.F.M.; Santos, R.G.; Gurgel, E.P.; Diniz, J.C.; Rocha, S.A.S.; Viana, F.A. Effect of salt stress on the growth of *Lippia gracilis* Schauer and on the quality of its essential oil. Acta Botanica Brasílica, v.28, n.3, p.346-351, 2014. <https://doi.org/10.1590/0102-33062014abb3369>.
- Ribeiro, M.S.S.; Costa, R.S.; Amorim, A.V.; Lacerda, C.F.; Dias, N.S. Biometria e óleo essencial de alecrim pimenta cultivado em diferentes épocas e condições de luminosidade. Revista Brasileira de Agricultura Irrigada, v.10, n.6, p.1086-1095, 2016. <https://doi.org/10.7127/rbai.v10n600539>.
- Sá, F.V.S.; Araujo, J.L.; Oliveira, F.S.; Silva, L.A.; Moreira, R.C.L.; Silva Neto, A.N. Influence of silicon in papaya plant growth. Científica, v.43, n.1, p.77-83, 2015. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2015v43n1p77-83>.
- Santos, M.D.; Blatt, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. Brazilian Journal of Botany, v.21, n.2, p.135-140, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0100-84041998000200004>.
- Schleier, R.; Galitesi, C.R.L.; Ferreira, E.C.M. Silício e cálcio – uma abordagem antroposófica. Arte Médica Ampliada, v.34, n.3, p.102-113, 2014. <http://abmanacional.com.br/arquivo/b5a7f787bfdac3cf77b4a2115f006b55f3f92d9-34-3-silicio-e-calcio.pdf>. 08 Jul. 2018.
- Sebastian, D.; Rodrigues, H.; Kinsey, C.A. 5-day method for determination of soluble silicon concentrations on nonliquid fertilizer materials using a sodium carbonate-ammonium nitrate extractant followed by visible spectroscopy with heteropoly blue analysis: Single-Laboratory Validation. Journal of AOAC International, v.96, n.2, p.251-259, 2013. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-243>.
- Silva, L.R.; Vale, L.; Calou, B.F.; Meireles de Deus, M.S.; Ferreira, P.M.P.; Peron, A.P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. Acta Toxicológica Argentina, v.23, n.1, p.36-43, 2015. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ata/v23n1/v23n1a04.pdf>. 22 Jun. 2018.

- Souza, L.M. Flavonoides totais, atividade antioxidante e variação sazonal da composição química do óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides* Kunth.). Montes Claros: Universidade Federal de Minas Gerais, 2015. 118p. Dissertação Mestrado. <http://hdl.handle.net/1843/NCAP-9XXHP9>. 05 Nov. 2017.
- Taiz, L.; Zeiger, E. Fisiologia vegetal. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.
- Teodoro, P.E.; Ribeiro, L.P.; Oliveira, E.P.; Corrêa, C.C.G.; Torres, F.E. Dry mass in soybean in response to application leaf with silicon under conditions water deficit. *Biocience Journal*, v.31, n.1, p.161-179, 2015. <https://doi.org/10.14393/BJ-v31n1a2015-22283>.