

**O déficit hídrico altera o crescimento, metabolismo oxidativo e biossíntese de  
fenilpropanóides em *Ocimum basilicum* L.**

**Water deficit induces changes in grown, oxidative metabolism and phenylpropanoids  
biosynthesis in *Ocimum basilicum* L.**

**El déficit hídrico altera el crecimiento, el metabolismo oxidativo y la biosíntesis de  
fenilpropanoides en *Ocimum basilicum* L.**

Recebido: 25/11/2020 | Revisado: 26/11/2020 | Aceito: 27/11/2020 | Publicado: 02/12/2020

**Patrícia Fernanda Augusto Motta Novello**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0788-9474>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: [ppatymaionese@yahoo.com](mailto:ppatymaionese@yahoo.com)

**Cristine Bonacina**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4359-5617>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: [cristinebonacina@hotmail.com](mailto:cristinebonacina@hotmail.com)

**Juliana Stracieri**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4670-8349>

Universidade Estadual de Santa Cruz, Brasil

E-mail: [juliana.uem@outlook.com](mailto:juliana.uem@outlook.com)

**Caio Franco de Araújo Almeida Campos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5689-4785>

UniCesumar, Brasil

E-mail: [caiofaac@hotmail.com](mailto:caiofaac@hotmail.com)

**José Eduardo Gonçalves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2035-4167>

Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação, Brasil

E-mail: [jose.goncalves@unicesumar.edu.br](mailto:jose.goncalves@unicesumar.edu.br)

**Zilda Cristiani Gazim**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0392-5976>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: [cristianigazim@prof.unipar.br](mailto:cristianigazim@prof.unipar.br)

**Silvia Graciele Hülse de Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1994-6229>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: [silviahulse@prof.unipar.br](mailto:silviahulse@prof.unipar.br)

## **Resumo**

Mudanças fisiológicas e bioquímicas ocorrem quando as plantas são submetidas ao estresse hídrico. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento, a resposta antioxidante, o rendimento e a composição do óleo essencial (OE) do manjericão (*Ocimum basilicum* L.) submetidas ao déficit hídrico. O experimento foi conduzido em casa de vegetação sob três regimes hídricos: 100-90% (controle), 70-60% (estresse moderado), 40-30% (estresse severo) da capacidade de campo por 50 dias. Plantas submetidas ao estresse hídrico severo apresentaram reduções significativas na massa fresca e altura. O teor relativo de água nas folhas diminuiu com o aumento da severidade do estresse. Observamos um aumento na atividade de enzimas: superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em plantas submetidas ao déficit hídrico. As plantas submetidas ao estresse moderado e severo apresentaram maior rendimento do OE, além de alterar sua composição química. Um total de 54 compostos foram identificados no OE das folhas de manjericão. Os fenilpropanóides aumentaram com o déficit hídrico e podem constituir um sistema antioxidante secundário, que pode auxiliar o sistema de defesa antioxidante primário, a fim de manter os níveis de peróxido de hidrogênio nas células em concentrações sub-letais para as plantas de manjericão.

**Palavras-chave:** Plantas aromáticas, Estresse abiótico; Óleo essencial; Metabólito secundário.

## **Abstract**

Numerous physiological and biochemical changes occur when plants are subject to water stress. Therefore, the aim of this study was to evaluate growth, antioxidant response, yield and composition of essential oil of basil plants (*Ocimum basilicum* L.) when subject to water deficit. The experiment was conducted in a greenhouse and supplied with three water regimes: 100-90% (control), 70-60% (moderate stress), 40-30% (severe stress) of the field capacity for 50 days. Plants subjected to severe water stress showed significant reductions in the development of the shoot, as fresh mass and height. The relative water content in leaves decreased with increasing severity of stress. We observed an increase in the activity of

antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), and catalase (CAT) in plants subject to water deficit. Plants subject to moderate and severe stress had a higher oil essential yield, besides changing their chemical composition. A total of 54 compounds were identified in the essential oil from the basil leaves. The phenylpropanoids increased with water deficit and may constitute a secondary antioxidant system, which may assist the primary antioxidant defense system, in order to maintain the levels of hydrogen peroxide in the cells at sub-lethal concentrations to basil plants.

**Keywords:** Aromatic plant; Abiotic stress; Essential oil; Secondary metabolites.

### Resumen

Los cambios fisiológicos y bioquímicos ocurren cuando las plantas están sujetas a estrés hídrico. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento, la respuesta antioxidante, el rendimiento y la composición del aceite esencial (OE) de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sometido a déficit hídrico. El experimento se llevó a cabo en un invernadero bajo tres regímenes de agua: 100-90% (control), 70-60% (estrés moderado), 40-30% (estrés severo) de la capacidad de campo durante 50 días. Las plantas sometidas a estrés hídrico severo mostraron reducciones significativas en peso fresco y altura. El contenido relativo de agua en las hojas disminuyó al aumentar la severidad del estrés. Se observó un aumento de la actividad enzimática: superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) en plantas sometidas a déficit hídrico. Las plantas sometidas a estrés moderado y severo presentaron mayor rendimiento de OE, además de cambiar su composición química. Se identificaron un total de 54 compuestos en el OE de las hojas de albahaca. Los fenilpropanoides aumentan con el déficit hídrico y pueden constituir un sistema antioxidante secundario, que puede ayudar al sistema de defensa antioxidante primario, para mantener los niveles de peróxido de hidrógeno en las células en concentraciones subletales para las plantas de albahaca.

**Palabras clave:** Planta aromática; Estrés abiótico; Aceite esencial; Metabolitos secundarios.

### 1. Introdução

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta aromática anual, cultivada e utilizada em todo o mundo (Lung et al., 2016). Essa planta é bastante utilizada como condimento, mas também muito conhecida na medicina popular por suas propriedades medicinais (Padalia et al., 2017). O valor econômico do manjeriço deve-se principalmente à

produção de óleo essencial (OE), alcançando níveis significativos de comercialização no mercado nacional e internacional (Lung et al., 2016). O óleo essencial obtido dessa espécie é amplamente utilizado na indústria de perfumaria e na aromatização de alimentos e bebidas, e possui na sua composição vários compostos, no qual o linalool, um monoterpene, amplamente utilizado nas indústrias de cosméticos e perfumaria se destaca devido seu potencial de fixação (Blank et al., 2004).

Em plantas aromáticas, o crescimento, desenvolvimento e a produção do óleo essencial são influenciados por vários fatores ambientais, promovendo alterações físicas e químicas no metabolismo vegetal (Baghalian et al., 2011; Rezaie et al., 2020). A baixa disponibilidade de água no solo, pode influenciar o fechamento estomático, o declínio na taxa de crescimento, o acúmulo de solutos e enzimas antioxidantes e a expressão de genes associados a resposta aos diferentes estresses (Jaleel et al., 2009; Fathi et al., 2019). As plantas sob estresse hídrico também podem alterar sua espessura, área foliar e características anatômicas assim como a taxa de transpiração, a condutância estomática e a taxa fotossintética (Baghalian et al., 2011; Abideen et al., 2020). A baixa quantidade de água no solo induz também mudanças no padrão de translocação de matéria seca.

Para sobreviver a tais condições ambientais, as plantas desenvolveram uma complexa rede de sinalização genético-molecular e celular que as levam a responder por diferentes vias metabólicas. Os metabólitos secundários estão envolvidos em diferentes mecanismos de defesa frente os estresses abióticos, sendo que a deficiência hídrica está entre as principais causas de perda da produtividade, porém, apresenta correlação direta na concentração de metabólitos secundários (Vickers et al., 2009). O estresse hídrico geralmente induz um aumento na concentração de alguns terpenóides e fenilpropanóides (Borges et al., 2016; Rezaie et al., 2020). Para tanto, os terpenos e os fenilpropanóides são as classes de compostos abundantes no óleo essencial encontrado nessa espécie.

Devido aos danos provocadas pelo estresse, como forma de defesa, as plantas produzem as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Jaleel et al., 2009). No entanto devido ao tempo que a planta fica submetida a estas condições, a produção das ROS aumenta e consequentemente provoca um grande dano, devido à produção excessiva de moléculas de oxigênio (radical aniônico superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Com isso diversas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) são ativadas para tentar inibir os danos ocorridos durante este processo (Kaouthar et al., 2016; Abideen et al., 2020).

Desta forma, com o intuito de avaliar a influência do estresse hídrico no crescimento do manjeriço, o presente estudo teve por objetivo mensurar o crescimento, a resposta antioxidativa das enzimas CAT, APX e SOD e o rendimento e composição química do OE de *Ocimum basilicum* em diferentes níveis de déficit hídrico.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Material vegetal**

O experimento foi realizado em casa de vegetação da Universidade Paranaense – UNIPAR, Campus III – Umuarama/PR (23° 45' 51,49" S; 53° 11' 35,01" O e altitude de 463 m). Sementes de manjeriço verde ‘Alfavaca Basilicão’ (ISLA®) foram semeadas em bandeja de poliestireno contendo substrato comercial (Carolina Padrão®). Em cada cédula foram distribuídas de cinco a seis sementes e realizada irrigação diária. Dez dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de cinco litros contendo solo:substrato:areia (2:1:1 v), no qual foi feito o desbaste deixando apenas uma planta por vaso.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três regimes hídricos (100-90% da capacidade de campo (CC) (controle), 70-60% CC (estresse moderado), 40-30% CC (estresse severo) com dez repetições. As plantas foram irrigadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) uma vez por semana, até o final do experimento. As plantas foram coletadas após 50 dias de estresse.

### **2.2 Altura e massa fresca da parte aérea – avaliações fitotécnicas**

A determinação da altura da parte aérea (APA) (cm) foi realizada com o auxílio de uma fita métrica, medido do colo da planta até o seu ápice foliar. A massa fresca da parte aérea (MFPA) (g pl<sup>-1</sup>) foi determinada a partir da pesagem em balança analítica.

### **2.3 Teor relativo de água na folha**

O teor relativo de água (TRA%) foi realizado em cinco folhas do terço médio de acordo com o método proposto por Rouached et al., (2013). Esse parâmetro foi determinado utilizando a seguinte equação (Schonfeld et al., 1988):

$$\text{TRA}\% = 100 \times (\text{MF}-\text{MS})/(\text{MT}-\text{MS})$$

Onde:

TRA% = teor relativo de água da planta (%);

MF = massa fresca (g);

MS = massa seca (g);

MT = massa túrgida (g).

## 2.4 Enzimas antioxidantes

As folhas frescas (0,3 g) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizado em 1,5 ml de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM, ácido ascórbico 200 mM e 10 % de polivinilpirrolidona (PVPP) utilizando almofariz e pistilo (Giannopolitis & Reis, 1977). O homogeneizado foi centrifugado a 12 000 g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante recolhido e armazenado em ultrafreezer (-80 °C) até o momento das leituras. Esse extrato foi utilizado para os ensaios das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Todos os ensaios foram realizados com três repetições biológicas em triplicata para cada um dos tratamentos.

### 2.4.1 SOD (EC 1.15.1.1)

A atividade da enzima SOD foi medida por sua capacidade de inibir a fotorredução do *nitroblue tetrazolium* (NBT) como descrito por Giannopolitis & Reis, 1977 (1977). A reação consistiu em KPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,8), 0,1 μM EDTA, 13 mM metionina, 75 μM de NBT, 2 μM de riboflavina e 50 μL do extrato bruto das amostras. A leitura foi realizada a 560 nm, no qual uma unidade de atividade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do NBT. A atividade da SOD foi expressa em U SOD g<sup>-1</sup>MF min<sup>-1</sup>.

### 2.4.2 CAT (EC 1.11.1.6)

A atividade da enzima CAT foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Havir & McHale (1987). A reação consistiu em KPO<sub>4</sub> 200 mM (pH 7,0), 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50 μL do extrato bruto das amostras. A atividade foi determinada pela degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no intervalo de 1 minuto a 240 nm. A atividade enzimática foi quantificada, utilizando-se o

coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Anderson et al., 1995). A atividade da CAT foi expressa em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g MF}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### 2.4.3 APX (EC 1.11.1.11)

A atividade da enzima APX foi realizada de acordo com a metodologia proposta por de Nakano & Asada (1987). A reação (1,0 mL) consistiu de 50 mM (pH 7,0) do tampão  $\text{KPO}_4$ , 10 mM de ácido ascórbico, 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 50  $\mu\text{L}$  do extrato bruto das amostras. A atividade foi determinada pela degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  no intervalo de 1 minuto a 290 nm. A atividade enzimática foi quantificada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Nakano & Asada, 1987). A atividade da APX foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de ácido ascórbico  $\text{g MF}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .

## 2.5 Extração do OE de *Ocimum basilicum*

A extração do OE foi realizada por meio do método de hidrodestilação por um período de três horas (Luz et al., 2009) utilizando-se 100 g/L de folhas frescas. O OE foi retirado com n-Hexano, filtrado em sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), acondicionado em frascos âmbar e mantidos sob refrigeração ( $4^\circ \text{C}$ ) até total evaporação do solvente (Brasil, 2010).

### 2.5.1 Rendimento do OE

Após a total evaporação do solvente foi feita a pesagem de cada extração de OE para o cálculo do rendimento do óleo essencial (ROE%). Esse parâmetro foi determinado utilizando a seguinte equação:

$$\text{ROE\%} = (\text{MOE}/\text{MFV}) \times 100$$

Onde:

ROE% = rendimento do óleo essencial (%);

MOE = massa do óleo essencial extraída (mL);

MFV=massa fresca vegetal (g).

## 2.5.2 Análise Cromatográfica do OE

O Óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), utilizando um cromatógrafo modelo Agilent (7890B) acoplado a um espectrofotômetro de massas, modelo Agilent (5977A). A coluna capilar utilizada foi uma HP-5MS de sílica fundida (30 m x 0,250). Temperatura do injetor: 260 °C; volume da injeção de 2 µL; razão de injeção no modo split 1:2, temperatura inicial da coluna de 40°C/2 min, com uma rampa de aquecimento de 4 °C/min até 300 °C. A linha de transferência foi mantida a 285°C e a fonte de ionização e quadrupolo a temperaturas de 230°C e 150°C, respectivamente. O gás hélio (He) foi utilizado como sendo gás de arraste com fluxo de 1 mL/min. O sistema de detecção foi o EM no modo “Scan”, na faixa de razão massa/carga ( $m/z$ ) de 40-350, com “Solvent Delay” de 3 min.

A análise dos compostos químicos do óleo essencial foram realizados por meio da comparação dos espectros de massas com os espectros de massas da biblioteca NIST 11.0 e baseados na comparação dos seus índices de retenção (IR) obtidos através de uma série homóloga do padrão de n-alcenos (C7 - C26) (Adams, 2007).

## 2.6 Análise estatística

Trata-se de uma pesquisa experimental quantitativa com coleta e análise estatística dos dados (Pereira et al., 2018). Desta forma, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ( $p \leq 0,05$ ) e as médias comparadas pelo teste de média Tukey ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o programa estatístico Assistat (Silva & Azevedo, 2016). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para discriminar como os compostos do essencial do óleo foram influenciados pelo déficit hídrico. As variáveis foram analisados pelo software Statistica v 13.3 (STATSOFT, 2017).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Efeito do estresse hídrico no crescimento das plantas de *O. basilicum*

Os resultados mostraram que a altura, a massa fresca da parte aérea e o teor de água na folha foram significativamente influenciados pelos diferentes níveis de estresse, afetando negativamente esses parâmetros avaliados (Tabela 1). As plantas que foram submetidas a uma

restrição de água apresentaram um porte menor do que as plantas do controle, no qual a altura da haste foi significativamente reduzida em 6,13% e 12,17% para os estresses moderado e severo, respectivamente. O efeito depressivo da seca sobre o acúmulo de massa fresca foi mais pronunciado na maior restrição de água. No acúmulo de massa fresca foi possível observar a seguinte ordem de acúmulo: moderado > controle >severo. As plantas que foram submetidas ao estresse moderado apresentaram um crescimento mais significativo que os demais tratamentos, enquanto as plantas submetidas ao estresse severo apresentaram uma redução no acúmulo de biomassa de 18,94% em relação as plantas do controle. O teor de água nas folhas apresentou uma diferença significativa entre os tratamentos controle e estresse moderado em relação ao estresse severo, no qual a quantidade de água nas folhas foi menor, quanto maior o estresse (Tabela 1).

**Tabela 1.** Altura (cm), massa fresca e teor de água (%) da parte aérea (PA) de plantas de *Ocimum basilicum* L submetidas a diferentes níveis de déficit hídrico.

Tratamento	Altura (cm)	Massa Fresca (g. pl <sup>-1</sup> )	Teor de Água na folha (%)
Controle	63,25 a <sup>1</sup>	123,78 b	71,58 a
Moderado	59,37 ab	163,32 a	64,88 ab
Severo	55,50 b	100,33 c	53,02 b

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) de probabilidade.

Fonte: Autores.

A redução da altura das plantas de manjeriço submetidas ao déficit hídrico pode ser resultado de perturbações das relações hídricas das plantas, em especial o potencial de turgor. Isto significa que ao reduzir a absorção de água, conseqüentemente há uma diminuição no conteúdo de água no tecido vegetal e no turgor. Portanto, sob condições de estresse, o alongamento celular em plantas é inibido pela reduzida pressão de turgescência. Da mesma forma, o estresse pela seca também diminui o acúmulo de fotoassimilados e metabólitos necessários para a divisão celular (Baghalian et al., 2011). Como consequência, a mitose, o alongamento e expansão celular são prejudicadas, resultando na redução da altura e crescimento da planta (Farooq et al., 2009).

A diminuição no acúmulo de biomassa das plantas de manjeriço submetidas a um déficit hídrico severo (Tabela 1) poderia ser o resultado de uma atribuição preferencial da

produção de biomassa às raízes. Além disso, uma redução no teor de clorofila poderia acarretar uma deficiência na taxa de fotossíntese, o que também contribui para a redução da massa fresca da parte aérea dessa planta. Este fenômeno fisiológico também foi observado nos estudos conduzidos por Petropoulos et al., (2008) e Borges et al., (2016) em *Petroselinum crispum* (família Apiaceae) e por Baghalian et al., (2011) em *Matricaria recutita* L. (família Asteraceae).

### 3.2 Resposta das enzimas antioxidantes ao estresse hídrico

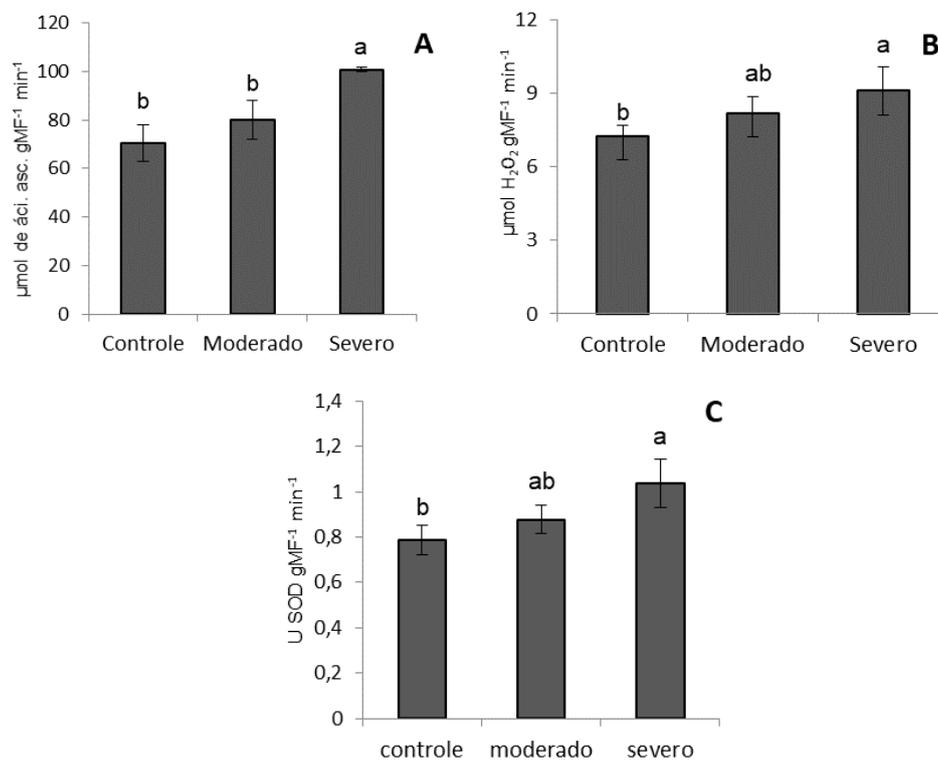
O estresse hídrico induz o estresse oxidativo em plantas, nas quais espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxil ( $\bullet OH$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical alcoxil ( $RO \bullet$ ) são produzidos (Munne-Bosch & Penuelas, 2003). Sendo assim, neste trabalho foram avaliadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), que formam um importante complexo de enzimas que atuam como defesa primária das células contra os radicais livres superóxidos geradas sob condições de estresse.

No presente trabalho, foi observado que as enzimas antioxidantes em *O. basilicum* L. apresentaram uma maior defesa quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico severo para as três enzimas avaliadas (Figura 1). Foi observado uma redução da atividade da enzima SOD ( $0,78 \text{ U SOD g MF}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) nas plantas do controle. De acordo com as nossas observações, a atividade da enzima SOD foi aumentada em 11,53% e 34,61% nas plantas que foram submetidas aos estresses moderado e severo, respectivamente, em comparação com as plantas do controle (Figura 1A). Esta enzima catalisa a dismutação de superóxido resultando na produção de  $O_2$  e  $H_2O_2$ , e é quantitativamente a maior responsável pela remoção de superóxido. A maior atividade da enzima SOD pode ter uma maior proteção contra o estresse oxidativo nessa espécie de manjeriço. Assim o aumento na atividade da SOD é conhecido por conferir tolerância a situações ambientais limitantes (Jaleel et al., 2009; Laxa et al., 2019). Diferentes trabalhos mostraram que as plantas transgênicas que superexpressam o gene que codifica a SOD mostrou uma tolerância aumentada aos diferentes tratamentos, bem como se tornaram mais resistentes à fotoinibição quando expostas a diferentes estresses abióticos (Kaouthar et al., 2016).

Da mesma forma que a enzima SOD, observamos um aumento na atividade da CAT e APX sob déficit hídrico. Conforme mostrado na Figura 1B, a atividade de CAT aumentou 12,95% e 25,76% em plantas expostas aos estresses hídricos moderado e severo em

comparação com o controle. A CAT é a única entre as enzimas degradantes de  $H_2O_2$  que não consome equivalentes redutores celulares e possui ainda um eficiente mecanismo para remover o  $H_2O_2$  formado nas células sob condições de estresse (Scandalios, 2005). A Figura 1C mostrou que a atividade da enzima APX não diferiu significativamente entre os tratamentos controle e o estresse moderado. Entretanto, em plantas submetidas ao estresse severo pode-se observar que houve um aumento da atividade da enzima APX de 40,96% em relação às plantas do controle.

**Figura 1.** Resposta antioxidante das enzimas APX ( $\mu\text{mol}$  ácido ascórbico  $\text{gMF}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) (A); CAT ( $\mu\text{mol}$   $H_2O_2$   $\text{gMF}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) (B); SOD ( $\text{U SOD}$   $\text{gMF}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) (C) frente aos efeitos provocados pelo estresse hídrico em *Ocimum basilicum* L. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autores.

A ação combinada da CAT e SOD convertem o  $O_2^{\cdot-}$  tóxico e o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular, evitando o dano celular sob condições ambientais adversas como o estresse hídrico. Isso mostra que as enzimas CAT e APX desempenham um papel chave na eliminação do radical  $H_2O_2$  em plantas de manjericão submetidas ao estresse hídrico, sendo

que uns aumentos na atividade dessas enzimas estão estritamente correlacionados com a tolerância dessas plantas ao estresse oxidativo (Laxa et al., 2019).

### 3.3 Rendimento e composição química do óleo essencial de manjeriço

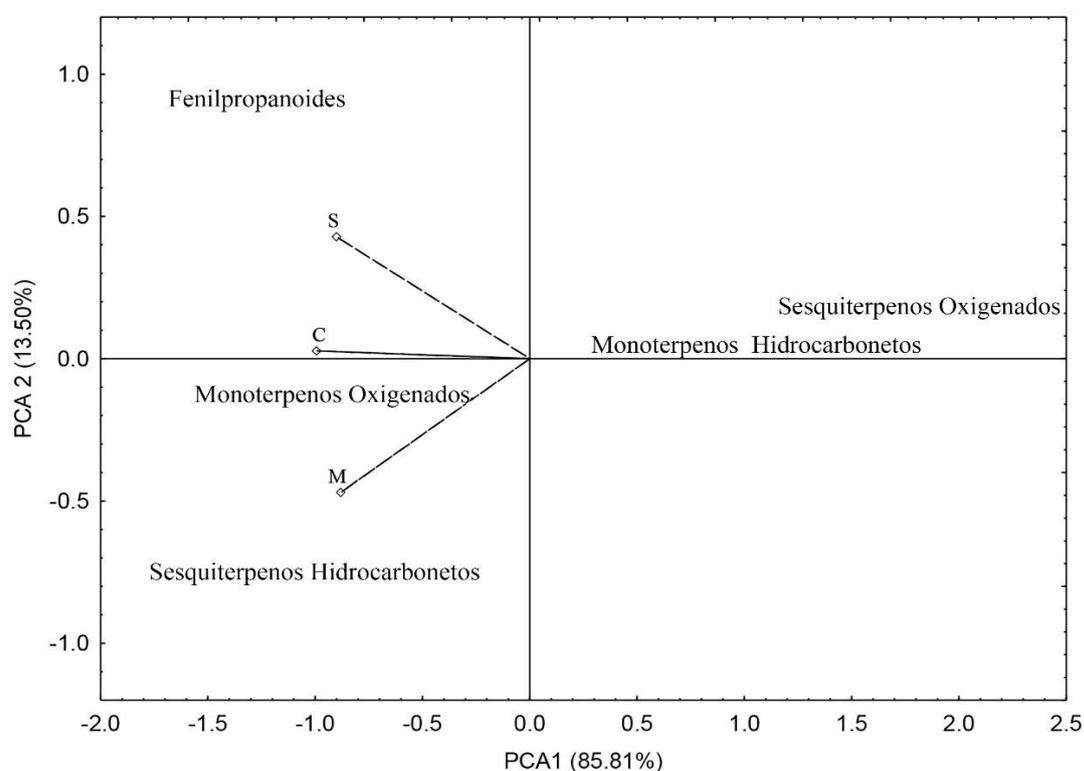
Com um rendimento de 0,039% no tratamento controle, a produção de óleo essencial aumentou para 0,146% e 0,116% sob condições de estresse moderado e severo, respectivamente (Tabela 2). Ambos os estresses, moderado e severo, melhoraram o rendimento de óleo essencial em manjeriço. O aumento no rendimento do EO pode estar relacionado a uma realocação do carbono assimilado devido ao declínio no crescimento da planta (De Abreu & Mazzafera, 2005). Além disso, sob condições de estresse há uma maior densidade de glândulas de óleo devido à redução na área foliar, o que pode resultar em um elevado acúmulo de OE (Bettaieb et al., 2009). Resultados similares foram encontrados em outras espécies de plantas cultivadas aromáticas em condições de déficit hídrico, como a salsa (*Petroselinum crispum*) (Petropoulos et al., 2008) e sálvia (*Salvia officinalis*) (Bettaieb et al., 2009). Entretanto, o efeito sobre o rendimento do OE pode variar bastante com o tipo, a intensidade e a duração do estresse, podendo aumentar ou diminuir o teor do óleo essencial.

A análise química por CG/EM identificou 53 compostos no OE obtido das folhas de *Ocimum basilicum* submetidos a um déficit hídrico (Tabela 2). Um média de 99,99% de OE foi identificado e pertencem a cinco classes químicas: monoterpenos hidrocarbonetos e oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados e os fenilpropanóides. Os compostos majoritários identificados em todos os tratamentos foram: estragole (TC=24,52%; TMS=4,33%; TSS=15,79%), linalol (TC=18,45%; TMS=10,34%; TSS=14,84%) e o eugenol (TC=10,12%; TMS=12,26%; TSS=15,12%). Além desses compostos, foi possível observar em porcentagens menores a ocorrência de 1,8 cineole, *cis*- $\alpha$ -bergamotene,  $\beta$ -elemene, myrcene,  $\alpha$ -pinene em todos os tratamentos avaliados (Tabela 2). Esses compostos são comumente encontrados no óleo essencial das folhas de *O. basilicum*, entretanto a sua composição pode variar em função do genótipo, local, tipo de cultivo, fatores ambientais e tipo de extração (Padalia et al., 2017).



O déficit hídrico em plantas medicinais pode alterar a biossíntese dos metabolitos secundários. Neste trabalho, a Análise de Coordenadas Principais (PCA) foi aplicada com o intuito de verificar o comportamento das diferentes classes químicas do OE, quando plantas de *O. basilicum* foram submetidas a diferentes níveis de déficit hídrico. A análise de PCA apresentou uma variância total de 99,31%, no qual as componentes principais PC1 e PC2 explicam 85.81% e 13.50% da variância total, respectivamente (Figura 2). Os resultados da PCA separaram as classes dos compostos do OE de manjeriço de acordo com os tratamentos, havendo a formação de três grupos distintos (Figura 2). A PCA mostrou que os monoterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados estão principalmente associados com a região do controle do biplot, enquanto os monoterpenos oxigenados e os sesquiterpenos hidrocarbonetos estão na região do estresse moderado. Os fenilpropanoides foram os mais afetados pelo déficit hídrico e estão associados à região de estresse severo (Figura 2 e Tabela 2). Isso mostra que os fenilpropanoides foram a classe de compostos que mais foi afetada pelo estresse hídrico severo.

**Figura 2.** Representação biplot dos compostos do óleo essencial (OE) das plantas de *Ocimum basilicum* L submetidos a diferentes déficits hídricos de acordo com a Análise de Componentes Principais (PCA). (C: controle; M: estresse moderado e S: estresse severo).

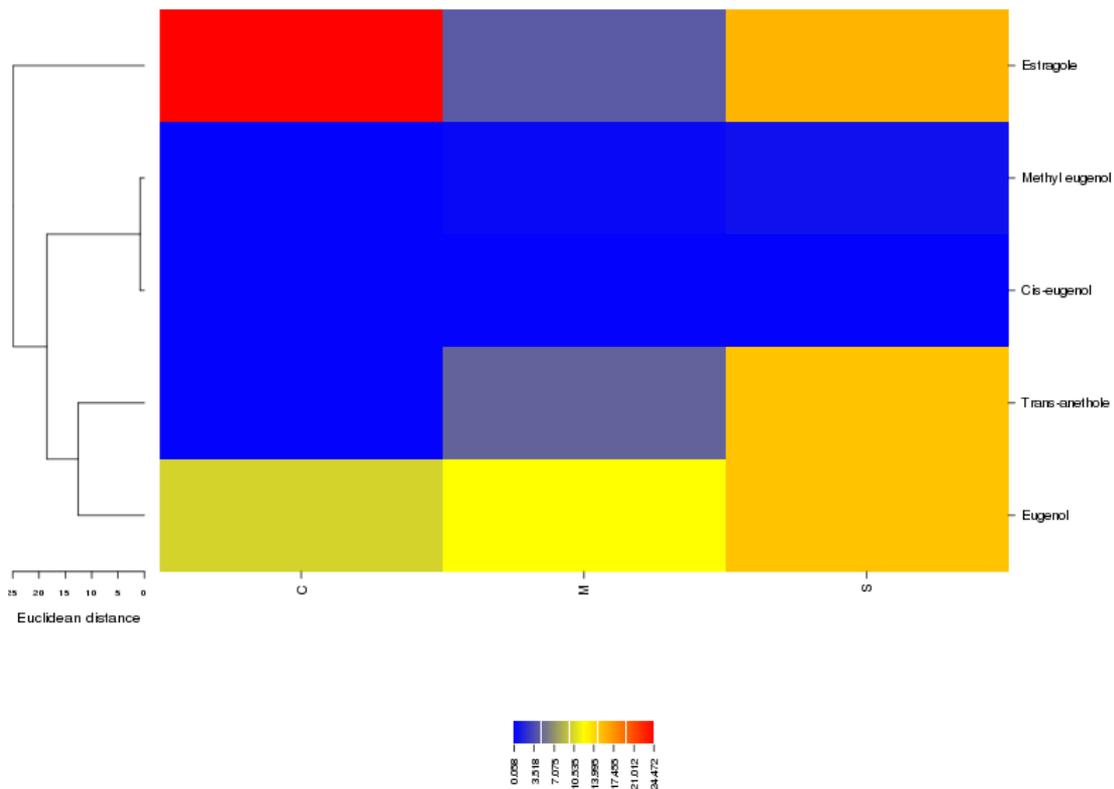


Fonte: Autores.

A ativação do metabolismo secundário é de particular importância quando o estresse à seca se torna severo (Brunetti et al. 2015; Velikova et al, 2016). O principal responsável em aumentar a síntese de metabólitos secundários sob o estresse hídrico é a provável inibição da fotossíntese e o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por excesso de oferta de equivalentes redutores. O aumento dos monoterpenos hidrocarbonetos e dos sesquiterpenos hidrocarbonetos no estresse moderado, sugere que a produção desses isoprenóides ocorre mesmo em condições de estresse, quando a fotossíntese é quase ou completamente inibida ou quando o carbono não está disponível). Isso ocorre porque os isoprenóides voláteis podem regular as reações de formação de ROS além de estabilizar a estrutura da membrana da tilacóide (Velikova et al., 2011). Esses compostos podem ativar respostas ao estresse oxidativo, pois são lipofílicos e podem estabilizar fisicamente as interações hidrofóbicas nas membranas celulares, minimizando a peroxidação lipídica, reduzindo o estresse oxidativo e a acumulação de ROS (Vickers et al., 2009).

Nesse trabalho observamos que houve uma alteração na biossíntese dos fenilpropanóides. Entre os fenilpropanóides, trans-anethole e eugenol foram os compostos do OE que apresentaram um aumento no estresse severo de 1.518% e 49,4%, respectivamente, enquanto que o estragole reduziu no estresse moderado (Figura 3). Os compostos methyl-eugenol e cis-eugenol não sofreram com o déficit hídrico, uma vez que não observamos alterações nesses compostos quando submetidos aos diferentes tratamentos. Os fenilpropanóides são derivados do ácido transcinâmico que é formado a partir do aminoácido fenilalanina em uma reação catalisada pela enzima fenilalanina amônio liase (PAL). A atividade desta enzima em plantas é aumentada como consequência de estresses bióticos e abióticos e está relacionada à síntese de fenilpropanóides (Dudareva et al., 2013). A atividade desta enzima em plantas é aumentada como consequência de estresses bióticos e abióticos e está relacionada à síntese de fenilpropanóides (Brunetti et al. 2015; Velikova et al, 2016).

**Figura 3.** Heatmap e distância euclidiana dos fenilpropanóides identificados no óleo essencial (OE) das plantas de *Ocimum basilicum* L submetidos a diferentes déficits hídricos. (C: controle; M: estresse moderado e S: estresse severo).



Fonte: Autores.

#### 4. Conclusão

O presente trabalho mostrou que quando submetida a um nível maior de estresse hídrico severo, a planta resulta em uma diminuição no desenvolvimento da parte aérea, diminuiu a massa fresca (g) e altura (cm). O teor relativo de água diminuiu com o aumento da severidade do estresse. Houve um incremento das enzimas antioxidantes APX, SOD e CAT com o aumento do déficit hídrico. Os diferentes níveis de déficit hídrico aumentaram o rendimento e influenciou a composição química, aumentado principalmente os fenilpropanóides quando submetido ao estresse severo. Novos estudos deverão ser conduzidos com o intuito de compreender a atividade das enzimas e dos genes responsáveis pela regulação da rota de produção dos fenilpropanóides em situações de estresse.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à UNIPAR e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro à pesquisa e à CAPES e CNPq pelas bolsas de estudos.

## Declaração de Divulgação

Os autores declaram não haver competição de interesse e permitem a divulgação.

## Referências

Abideen, Z., Koyro, H.-W., Huchzermeyer, B., Ansari, R., Zulfiqar, F., Gul, B. (2020). Ameliorating effects of biochar on photosynthetic efficiency and antioxidant defence of *Phragmites karka* under drought stress. *Plant Biology*, 22, 259-266.

Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. (4a ed.) Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation.

Anderson, M. D., Prasad, T. K., Stewart, C. R. (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109 (4), 1247-1257.

Baghalian, K., Abdoshah, S., Khalighi-Sigaroodi, F., Paknejad, F. (2011). Physiological and phytochemical response to drought stress of German chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (2), 201-207.

Bettaieb, I., Zakhama, N., Aidi-Wannes, W., Kchouk, M. E., Marzouk, B. (2009). Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae*, 120, 271-275.

Blanch, J. S., Peñuelas, J., Llusà, J. (2007). Sensitivity of terpene emissions to drought and fertilization in terpene-storing *Pinus halepensis* and non-storing *Quercus ilex*. *Physiologia Plantarum*, 131 (2), 211-225.

Brunetti, C., Guidi, L., Sebastiani, F., Tattini, M. (2015). Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environmental and Experimental Botany*, 119, 54–62.

Borges, I. B., Cardoso, B. K., Silva, E. S., de Oliveira, J. S., da Silva, R. F., de Rezende, C. M., Gonçalves, J. E., Junior, R. P., de Souza, S. G. H., Gazim, Z. C. (2016). Evaluation of performance and chemical composition of *Petroselinum crispum* essential oil under different conditions of water deficit. *African Journal of Agricultural Research*, 11 (6), 480–486.

Brasil. (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Farmacopeia Brasileira*. (5a ed), Anvisa, Brasília.

De Abreu, I. N., & Mazzafera, P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 241-248.

Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 98, 16–32.

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29 (1), 185-212.

Fathi, E., Majdi, M., Dastan, D., Maroufi, A. (2019). The spatio-temporal expression of some genes involved in the biosynthetic pathways of terpenes/phenylpropanoids in yarrow (*Achillea millefolium*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 43-52.

Giannopolitis, I., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59 (2), 309-314.

Jaleel, C. A. P., Manivannan, A., Wahid, M., Farooq, R., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11, 100-105.

Havir, E. A. & McHale, N. A. (1987). Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84 (2), 450-455.

Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water culture method for growing plants without soils. *California Agricultural Experiment Station*, 347, 1-32.

Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., Dietz, K.-J. (2019). The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. *Antioxidants*, 8, 94.

Lung, I., Soran, M. L., Ocsana, O., Mihail R. C. T., Ülo. N., Lucian. C. (2016). Induction of stress volatiles and changes in essential oil content and composition upon microwave exposure in the aromatic plant *Ocimum basilicum*. *Science of The Total Environment*, 569-570, 489-495.

Luz, J. M. Q., Morais, T. P. S., Blanck, A. F., Sodr , A. C. B., Oliveira, G. S. (2009). Teor, rendimento e composi o qu mica do  leo essencial de manjeri o sob doses de cama de frango. *Horticultura Brasileira*, 27 (3), 349-353.

Munn -Bosch, S., & Pe uelas, J. (2003). Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants, *Planta*, 217 (5), 758-756.

Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22 (5), 867-880.

Padalia, R. C., Verma, R. S., Upadhyay, R. K., Chauhan, A., Singh, V. R. (2017). Productivity and essential oil quality assessment of promising accessions of *Ocimum basilicum* L. from north India. *Industrial Crops and Products*, (97), 79-86.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa cient fica*. UFSM, NTE.

Petropoulos, S. A., Daferera, D., Polissiou, M. G., Passam. H. C. (2008). The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Scientia Horticulturae*, 115, 393-397.

Kaouthar, F., Ameny, F. K., Yosra, K., Walid, S., Ali, G., Faiçal, B. (2016). Responses of transgenic *Arabidopsis* plants and recombinant yeast cells expressing a novel durum wheat manganese superoxide dismutase TdMnSOD to various abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 198, 56-68.

Rezaie, R., Abdollahi Mandoulakani, B. A., Fattahi, M. (2020). Cold stress changes antioxidant defense system, phenylpropanoid contents and expression of genes involved in their biosynthesis in *Ocimum basilicum* L. *Scientific Reports*, 10, 5290.

Rouached, A., Slama, I., Zorrig, W., Jdey, A., Cukier, C., Rabhi, M., Talbi, O., Limami, A.M., Abdelly, C. (2013). Differential performance of two forage species: *Medicago truncatula* and *Sulla carnosa* under water deficit stress and recovery. *Crop Pasture Science*, 64 (3), 254-264.

Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38 (7), 995-1014.

Schonfeld, M. A., Johnson, R. C., Carwer, B. F., Mornhinweg, D.W. (1988). Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science*, 28, 526-531.

Silva, F. A. S., & Azevedo, C. A. V. (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African Journal of Agricultural Research*, 11(39), 3733-3740.

STATSOFT. (2017). *Statistica for Windows [Computer program manual]*. 13.3. Tulsa: StatSoft,

Velikova, V., Brunetti, C., Tattini, M., Doneva, D., Ahrar, M., Tsonev, T., Stefanova, M., Ganeva, T., Gori, A., Ferrini, F., Varotto, C., Loreto, F. (2016). Physiological significance of

isoprenoids and phenylpropanoids in drought response of Arundinoideae species with contrasting habitats and metabolism. *Plant Cell and Environment*, 39, 2185-2197.

Velikova, V., Várkonyi, Z., Szabó, M., Maslenkova, L., Nogues, I., Kovács, L., Peeva, V., Busheva, M., Garab, G., Sharkey, T. D., Loreto, F. (2011). Increased thermostability of thylakoid membranes in isoprene-emitting leaves probed with three biophysical techniques. *Plant Physiology*, 157, 905-916.

Vickers, C. E., Gershenzon, J., Lerdau, M. T., Loreto, F. (2009). A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology*, 5, 283-291.

**Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Patrícia Fernanda Augusto Motta Novello – 20%

Cristine Bonacina – 15%

Juliana Stracieri – 10%

Caio Franco de Araújo Almeida Campos – 10%

José Eduardo Gonçalves – 10%

Zilda Cristiani Gazim – 15%

Silvia Graciele Hülse de Souza – 20%