

**TEOR E RENDIMENTO DE FLAVONÓIDES EM CALÊNDULA
(*Calendula officinalis* L.) CULTIVADA COM DIFERENTES LÂMINAS
DE IRRIGAÇÃO**

DANIELA PEREZ GUERRERO BORTOLO

**TEOR E RENDIMENTO DE FLAVONÓIDES EM CALÊNDULA
(*Calendula officinalis* L.) CULTIVADA COM DIFERENTES LÂMINAS
DE IRRIGAÇÃO**

DANIELA PEREZ GUERRERO BORTOLO

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientadora: Patricia Angélica Alves Marques

633.15
B739t

Bortolo, Daniela Perez Guerrero.

Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação / Daniela Perez Guerrero Bortolo – Presidente Prudente: 2008. 42 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2008.

Bibliografia

1. *Calendula officinalis* L. – irrigação. 2. Irrigação agrícola. 3. Tanque Classe A. I. Título.

DANIELA PEREZ GUERRRERO BORTOLO

Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos obtenção do título de Mestre em agronomia.

Presidente Prudente, 24 de setembro 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patricia Angélica Alves Marques
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. Tarlei Arriel Botrel
Universidade de São Paulo - ESALQ/USP
Piracicaba - SP

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos filhos, Sofia e Breno que por serem ainda tão pequenos não entenderam a minha ausência, mas que sempre me esperavam com amor e alegria, às vezes com lágrimas de saudades às vezes com um belo sorriso no rosto. Por isso dedico todas as minhas realizações a eles, que foram a minha maior força para contemplar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, senhor de todas as coisas, obrigada pela proteção divina durante toda essa caminhada.

À orientadora Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Angélica Alves Marques pela compreensão, dinamismo, competência e oportunidade de convívio, e também por entender minhas limitações, receberá sempre minha admiração e meu muito obrigada.

À Prof^ª. Dr^ª. Ana Claudia Pacheco Santos pelo exemplo de conhecimento, equilíbrio, calma e segurança transmitidas através de suas palavras ternas de incentivo. Muito obrigada pela disponibilidade e atenção.

Aos professores do mestrado Dr^ª. Ceci Castilho Custódio, Dr. Nelson Barbosa Machado Neto, Dr. Edson Luiz Piroli, Dr. José Salvador Simoneti Foloni, Dr. Sérgio do Nascimento Kronka, Dr. José Eduardo Creste, Dr. Gustavo Maia Souza, meu muito obrigada por todos os ensinamentos e incentivos nos momentos de desânimo. Obrigada sempre.

Aos alunos Daniela Madeira Mendonça; Ricardo Bezerra de Oliveira e Fernando Dourado Calado pelo apoio na condução no campo e colheitas.

Aos funcionários do laboratório Edna A. Torquato, Luciana M. Guaberto, Márcia Guaberto, pelo profissionalismo e dedicação prestadas, e as secretárias por todas as informações concedidas.

Aos meus pais Jairo Perez Guerrero e Luzia Clarice Campos que acreditaram sempre em mim, me ensinaram a sonhar, a lutar, e em especial a um grande amigo quase um verdadeiro pai Liomar Lopes Siqueira.

Ao casal Osvaldo Bortolo e Aparecida Bortolo que me fizeram companhia em minhas viagens, meu muito obrigada pela paciência e ajuda por tantos meses.

Ao meu esposo Alessandro Bortolo pela compreensão de meus objetivos e pela confiança, meu muito obrigado por tudo.

Aos meus amigos e irmãos pelo incentivo e pensamentos positivos!

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar vitória e glória mesmo expondo-se a derrota do que formar fila com os pobres de espíritos que sofrem muito por viverem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória, nem derrota.”

René Cassin.

RESUMO

Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação

A *Calendula officinalis* L. apresenta uso ornamental, culinário e terapêutico. A inflorescência é usada com ação cicatrizante e antiinflamatória. O experimento analisou o efeito de quatro lâminas de irrigação em condições de campo, na produção de flavonóides em calêndula. As lâminas baseadas na evaporação do Tanque Classe A (ECA) foram: 0, 50, 100 e 150% ECA; sendo aplicadas desde o início do florescimento até o final do ciclo da cultura. O teor de flavonóides não apresentou diferenças estatísticas. Os maiores valores de matéria seca de flores e rendimento de flavonóides foram obtidos no tratamento sem irrigação. O teor de prolina foi maior para o tratamento com estresse por excesso hídrico. A deficiência hídrica acumulada para o tratamento sem irrigação sinalizou uma possível morte por deficiência hídrica. Com a ocorrência da precipitação no período de pré-florescimento, a planta, originária do Mediterrâneo, respondeu com um florescimento abundante em massa e em número de flores. Assim, para região de Presidente Prudente São Paulo, caso não ocorra a reposição hídrica do solo apenas no período de pré-florescimento, é necessário o uso de irrigação complementar com 200 mm para induzir ao máximo florescimento e máximo rendimento de flavonóides por hectare.

Palavras-chave: *Calendula officinalis* L., manejo da irrigação, Tanque Classe A.

ABSTRACT

Content and yield of flavonoids in marigold plant (*Calendula officinalis* L.) under different irrigation depths

Calendula officinalis L. could be used as ornamental, culinary and therapeutic. The inflorescence is used as healing and anti-inflammatory. This experiment analyzed the effect of four different irrigations depth under field conditions in the production of flavonoids in the marigold plant (*Calendula officinalis* L.). The water depths were estimated upon the class A pan evaporation (CPE): 0, 50, 100 and 150% CPE. The depths were applied since of the beginning flowering until the end of culture cycle. There were no statistical differences in the flavonoids content. The higher dry weight flowers and flavonoids yield were obtained with the treatment without irrigation. The higher content of proline was found stressing the overwatering treatment. The accumulated water deficit for the treatment without irrigation signaled possible death by water deficit. With the precipitation occurrence in the pre-flowering, the plant, originated in the Mediterranean Basin, answered with abundant flourishing, in mass and in number of flowers. For Presidente Prudente region (São Paulo State, Brazil), if did not occur water replacement only in the pre-flowering, it will be necessary supplementary irrigation of 200 mm to induce the maximum flowering and yield per hectare of flavonoids.

Key Words: *Calendula officinalis* L., irrigation scheduling, class A pan evaporation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Aspectos da Cultura	11
2.2 Princípios Ativos	12
2.3 Efeito da Deficiência Hídrica sobre as Plantas	14
2.4 Efeito da Água sobre a Produção de Princípios Ativos	16
2.5 Produção de Prolina como Resposta ao Estresse	18
2.6 Manejo da Irrigação	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Localização do Experimento	21
3.2 Preparo das Mudanças e Transplante	22
3.3 Colheitas e Análises Finais	24
3.4 Teor de Flavonóides Totais	24
3.5 Teor de Prolina nas Folhas	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

Dentre os fatores de qualidade que influenciam o padrão da matéria prima obtida a partir de plantas medicinais são citados: o ambiente (fatores climáticos), o estágio de desenvolvimento da planta, as operações de pós-colheita (secagem e armazenamento) e a genética da planta (características herdáveis). Com relação ao ambiente, a água é um fator climático que exerce influência direta sobre desenvolvimento da planta e sua produção de princípios ativos. O teor destas substâncias pode aumentar ou diminuir de acordo com a variação deste fator. Uma planta medicinal, cultivada sob a aplicação de diferentes quantidades de água, poderá apresentar alterações qualitativas e quantitativas no seu metabolismo secundário.

Entre as plantas medicinais a calêndula possui importância econômica no Brasil. É uma planta de jardim que produz grande número de flores de colorido brilhante por um longo período, é originária da Europa Meridional e regiões mediterrâneas orientais que, além da utilização ornamental, tem uso culinário e terapêutico tradicionais. Esta espécie vem sendo estudada em relação aos flavonóides presentes em suas inflorescência com fins terapêutico como ação cicatrizante, antiinflamatória, emenagoga e antisséptica. Na indústria cosmética, a calêndula é utilizada para a composição de xampus, cremes e sabonetes e na indústria alimentícia como corante natural.

No Brasil são poucos os estudos sobre o efeito de diferentes regimes hídricos sobre a fisiologia (crescimento e desenvolvimento) e produção de metabólitos secundários em plantas medicinais, em praticamente todas as culturas. Muitos aspectos com relação à ecofisiologia destas plantas precisam ser esclarecidos, visando uma relação custo-benefício vantajosa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos da Cultura

A *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), pertence à família Asteraceae (Compositae) conhecida como mal-me-quer ou maravilha dos jardins é uma planta anual, herbácea anual com cerca de 50 cm de altura com folhas grossas, verdes, inteiras e pilosas. Apresenta flores dispostas em capítulos com 3 a 7 cm, liguladas na periferia, com corolas amareladas ou alaranjadas. É uma espécie originária do Mediterrâneo, caracterizado por verões quentes e secos e invernos frios e pouco chuvosos (MARTINS et al., 2000). Pode ser cultivada durante o ano todo, porém desenvolve-se melhor e é mais produtiva quando cultivada no inverno, sendo inclusive resistente à geadas leves (MONTANARI JUNIOR, 2000).

Entre as plantas medicinais a calêndula possui importância econômica no Brasil. Além da utilização ornamental, tem uso culinário e terapêutico tradicionais. Sua inflorescência é a parte da planta mais usada com fins terapêutico como ação cicatrizante, antiinflamatória e antisséptica (MARTINS et al., 2000; BRUNETON, 2001; HAMBURGUER et al., 2003).

O óleo da semente pode ter aplicações na fabricação de tintas e coberturas, cosmética e alguns produtos industriais de fibra sintética. Também é utilizada para o paisagismo e nas indústrias cosméticas e alimentícias e, por isso, possui grande interesse comercial, sendo seu cultivo, economicamente viável na agricultura familiar (BRUNETON, 2001). Na indústria cosmética, a calêndula é utilizada para a composição de xampus, cremes e sabonetes e na indústria alimentícia como corante natural (MONTANARI JUNIOR, 2000).

A calêndula começa a florir aos 90 dias após a semeadura e atinge o pico de produção aos 120 dias. O período de colheita pode durar até 60 dias aproximadamente, após o que a planta entra em declínio. A produção esperada na safra fica em torno de 720 kg ha⁻¹ de inflorescências secas, podendo chegar a 2000 kg ha⁻¹ (MONTANARI JUNIOR, 2000). Como a planta emite flores por um longo período, as colheitas devem ser feitas regularmente, colhendo-se somente as flores totalmente desenvolvidas, ainda sem início de formação de "sementes", com um

mínimo de pedúnculo. A colheita deve ser feita após a evaporação do orvalho. A colheita das flores promove o florescimento (SCHEFFER, 1992).

2.2 Princípios Ativos

As plantas medicinais vêm se tornando uma alternativa de renda a pequenos produtores rurais, por esse motivo é preciso se investir em pesquisas de práticas agrícolas para essas plantas (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005). O incremento no uso da fitoterapia, tanto para o tratamento como para a cura de doenças tem criado maior demanda para comunidade científica na realização de pesquisas visando o maior desenvolvimento e produtividade das plantas medicinais, sem comprometer os princípios ativos (SANTOS et al., 2004).

As funções fisiológicas dos princípios ativos nas plantas ainda não estão completamente esclarecidas, mas associa-se a sua produção à defesa da planta contra agentes externos como doenças, pragas ou aos resíduos do metabolismo vegetal. Estes princípios ativos possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie e são produzidos (quase todos) pelo metabolismo secundário das plantas (MARTINS et al., 2000). Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, intensidade de luz, exposição à UV e deficiência nutricional (CASTRO et al., 2005).

Entre os constituintes químicos potencialmente ativos da calêndula, são citados óleo essencial (até 0,02%), saponinas, flavonóides, carotenóides, mucilagens, resinas e princípio amargo. Contudo, os flavonóides têm papel mais importante na atividade farmacológica das flores de calêndula e também são marcadores para aferir a qualidade da matéria prima (BILIA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2004). Os flavonóides pertencentes à família Asteraceae têm se apresentado como marcadores taxonômicos, permitindo que algumas espécies sejam classificadas pelos flavonóides que estas produzem (EMERENCIANO et al., 2001; SHARP et al., 2001).

Os flavonóides são compostos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides presentes em abundância entre os metabólitos secundários de

vegetais. Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Dentre todas as classes de flavonóides, a *Calendula officinalis* L. possui principalmente flavonóis, representados na grande maioria pelos compostos quercetina e rutina (Figura 1) (VIDAL-OLLIVIER et al., 1989; RODRIGUES et al., 2004).

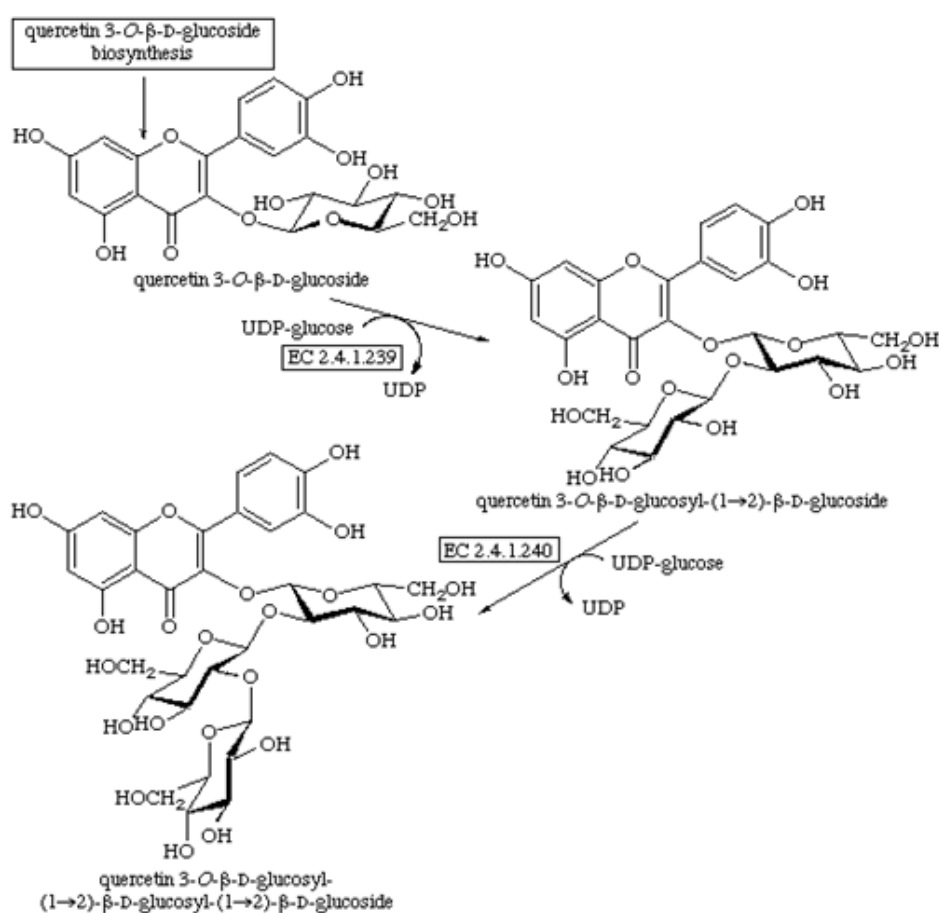


FIGURA 1 - Biossíntese do flavonóide quercetina da calêndula
Fonte: TOHGE (2006)

Estudos preliminares têm demonstrado que vários flavonóides possuem relevantes ações biológicas e previnem acidentes vasculares, sendo utilizados pelas indústrias farmacêuticas na preparação de agentes vaso dilatadores como a dosima e a rutina. Outros flavonóides como a quercetina e luteonina são abundantes na natureza e produzem significativa resposta antiinflamatória,

antinoceptiva quando testados com ácido acético, formalina e capsaicina (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

2.3 Efeito da Deficiência Hídrica sobre as Plantas

Com a demanda crescente por plantas medicinais de qualidade na terapêutica ou prevenção de doenças, o cultivo torna-se cada dia mais importante. Na produção de plantas medicinais, há diversos aspectos - intrínsecos, ambientais e técnicos - que influem na área cultivada e, conseqüentemente, na produção de metabólitos pela planta e utilização destes na elaboração de medicamentos (MING, 1994). De acordo com Andrade e Casali (1999) e Montanari Junior (2000), dentre os fatores de qualidade que influenciam o padrão da matéria prima obtida a partir de plantas medicinais citam-se: ambiente, estágio de desenvolvimento da planta, operações de pós-colheita, e genética da planta.

Entre as condições ambientais desfavoráveis às plantas, a deficiência hídrica destaca-se como fator adverso ao crescimento e à produção vegetal, sendo o fator climático que exerce influência direta sobre o desenvolvimento da planta e a produção de princípios ativos (CHARTZOULAKIS; DROSOS, 1997). A seca é considerada um estresse ambiental que, segundo Larcher (2004), é um estado em que a demanda de energia pela planta para sua manutenção (sobrevivência) é maior que a produção, o que leva a uma desestabilização inicial das funções da planta, seguida por uma normalização e indução dos processos fisiológicos de adaptação.

A deficiência de umidade afeta vários processos bioquímicos e fisiológicos e induz respostas metabólicas e fisiológicas, como o fechamento estomático, declínio na taxa de crescimento, acúmulo de solutos, de substâncias antioxidantes e expressão de genes específicos de estresse (SINGH-SANGWAN et al., 1994). A perda de água pode reduzir o potencial hídrico, causando diminuição na turgescência, condutância estomática, fotossíntese e, finalmente, menores crescimento e produtividade (KUMAR; SING, 1998).

Os efeitos da seca são bastante variáveis em função de sua intensidade (duração), da velocidade de imposição do estresse e do estágio de desenvolvimento da planta em que a seca ocorre. Os estádios de desenvolvimento

em que as culturas são, em geral, mais sensíveis ao déficit hídrico são a emergência, a floração e a fase inicial de frutificação, e menos na fase vegetativa ou de maturação do órgão colhido (PIMENTEL, 2004).

A produtividade das plantas, limitada pela água, depende da quantidade disponível deste recurso e da eficiência de seu uso pelo vegetal. Em condições de estresse hídrico, vários processos fisiológicos são alterados, tais como: fotossíntese, abertura estomática, produção de ácido abscísico, abscisão foliar e ajuste osmótico (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Estudos estão sendo realizados para avaliar o efeito de determinados estresses no desenvolvimento e produtividade de massa foliar pelas plantas medicinais. O estresse hídrico é um fator determinante para o cultivo e produção de determinadas espécies de plantas. Porém, nas espécies medicinais, a seca pode além do desenvolvimento, afetar o teor e rendimento do óleo essencial (SANTOS et al., 2004).

Silva et al. (2002) observaram que em *Melaleuca altermifolia* Cheel. a deficiência hídrica diminuiu o crescimento, a produção de biomassa seca das plantas e o teor de óleo essencial. Ahmed e El-Hassen (2001) relataram para dois cultivares de vinca (*Catharanthus roseus*) que com o aumento do intervalo de irrigação a altura da planta foi significativamente reduzida, já o número de ramos, o peso seco de raízes, a produção de folhas e o conteúdo de alcalóides foi maior. El-Din (2003) avaliando o anis (*Pimpinella anisum*), observou que o déficit hídrico proporcionou a maior produção de frutos e conteúdo de óleo essencial.

Singh (2004), estudando alecrim (*Rosmarinus officinalis*), obteve com 50% de evaporação do tanque classe A o maior crescimento e produção de óleo, porém não houve diferenças nem teor nem na qualidade do óleo. Segundo Carvalho et al. (2005) a diminuição na disponibilidade hídrica do substrato reduziu o teor de partenólídeo em plantas de artemísia (*Tanacetum parthenium*). Santos et al. (2004) estudando Sambacaitá (*Hyptis pectinata* L.), observaram o déficit de água induziu um abortamento das folhas pelas plantas, verificando-se uma redução de, aproximadamente, 66% da massa foliar com quatro dias de estresse hídrico.

De acordo com Farias (2006) a resposta das plantas à tensão de água no solo tem sido estudada como forma de controle da irrigação, já que irrigações deficitárias refletem diretamente na redução da produtividade, enquanto irrigações excessivas prejudicam a qualidade das flores.

2.4 Efeito da Água sobre a Produção de Princípios Ativos

A adaptabilidade das plantas em condições de estresse é influenciada pela duração e magnitude do estresse. A concentração de princípios ativos nas plantas depende do controle genético e também das interações genóticas e ambientais (ANDRADE; CASALI, 1999). Nas plantas, a alocação de carbono para a síntese de metabólitos secundários é determinada tanto pela disponibilidade de recursos edafoclimáticos (água, nutrientes, luz, concentração de CO₂), como por estresses específicos (seca, poluentes atmosféricos, radiação ultra-violeta, temperatura) (LAVOLA, 1998; KOUKI; MANETAS, 2002). Assim, vários fatores que afetam o crescimento, fotossíntese e outros aspectos do metabolismo primário, também causam efeitos no metabolismo secundário (LAVOLA et al., 2000).

Sendo a água um elemento essencial para a vida e o metabolismo das plantas, supõe-se que em ambientes mais úmidos a produção de princípios ativos seja maior. Porém, nem sempre isto é verdadeiro. Alguns resultados demonstraram que os efeitos negativos nos teores de princípios ativos são devidos mais ao excesso de água do que à falta, pois algumas espécies, sofrendo estresse hídrico em determinadas fases da cultura, produziram mais substâncias do metabolismo secundário, propiciando a ação de defesa da planta. Na natureza observa-se que em períodos mais secos, algumas espécies produzem maior quantidade de frutos para poder garantir sua perpetuação, mesmo em condições adversas (FURLAN, 1998; ANDRADE; CASALI 1999). Dessa maneira uma planta medicinal, cultivada sob a aplicação de diferentes quantidades de água, poderá apresentar alterações qualitativas e quantitativas no seu metabolismo secundário (CORRÊA JUNIOR et al., 1991; MONTANARI JUNIOR, 2000). Para determinar se a alteração foi benéfica ou prejudicial, deve ser feita uma análise química baseada na relação quantidade de massa seca / teor de princípios ativos, o que estabelecerá se a alteração no manejo de cultivo foi adequada ou não (MONTANARI JUNIOR, 2000; SANTOS et al., 2004).

O lento desenvolvimento de deficiência hídrica pode induzir ajuste osmótico em algumas espécies, resultando na manutenção da turgescência celular a baixos potenciais hídricos durante a condição de seca. O ajuste osmótico é um importante mecanismo de tolerância à seca, porque capacita a planta a continuar com a expansão celular, realizar ajustes estomáticos e fotossintéticos, melhorar o

crescimento vegetal e ter, em alguns casos, produção rentável (KUMAR; SING, 1998). Por outro lado, plantas irrigadas podem compensar o menor teor de princípios ativos com uma maior produção de biomassa o que resultará num maior rendimento final de princípios ativos por área (CORRÊA JUNIOR et al., 1991).

Ahmed e El- Hassen (2001) relatam os efeitos de regimes de irrigação (intervalos de 7, 14, 21 e 28 dias) sobre o desenvolvimento vegetativo e o conteúdo de alcalóides em dois cultivares de vinca (*Catharanthus roseus*). Para ambos os cultivares, a altura da planta foi significativamente reduzida com o aumento do intervalo de irrigação. Por outro lado, o número de ramos foi constantemente maior com o aumento do intervalo de irrigação, assim como o peso seco de raízes, a produção de folhas e raízes e o conteúdo de alcalóides. El-Din (2003) avaliou os efeitos de diferentes suprimentos de água (5, 10, 15 e 25 litros por lisímetro para solo arenoso e 2, 3, 4 e 5 litros por lisímetro para solo argiloso) sobre o crescimento e a produção de óleo essencial em anis (*Pimpinella anisum*). Em ambos os solos, as irrigações com 2 e 4 litros por lisímetro proporcionaram a maior produção de frutos, sendo que o déficit hídrico aumentou o conteúdo de óleo essencial nos mesmos.

Singh (2004) estudando alecrim (*Rosmarinus officinalis*). A irrigação com 0,50 de fração de evaporação do tanque classe A gerou o maior crescimento e produção de óleo, porém não houve diferenças no teor nem na qualidade do óleo.

Segundo Carvalho et al. (2005) a diminuição na disponibilidade hídrica do substrato reduziu a porcentagem de partenólídeo em plantas de artemísia (*Tanacetum parthenium*). Segundo os autores, a redução na produção de metabólitos secundários terpenóides, em situação estressante, pode ser estratégia de sobrevivência da planta. À semelhança de *Cymbopogon pendulus* e *C. nardus*, as plantas de *T. parthenium* cultivadas sob níveis reduzidos de água no solo, diminuem o crescimento e investem no ajuste osmótico por meio do acúmulo de prolina, por exemplo, como estratégia para se adaptar à condição de estresse hídrico (SINGH-SANGWAN et al., 1994).

2.5 Produção de Prolina como Resposta ao Estresse

Decréscimos do potencial osmótico devido ao acúmulo de solutos solúveis nas células constitui outra resposta ao estresse hídrico. O ajustamento osmótico produz um potencial hídrico foliar mais negativo, ajudando assim a manter o movimento de água para as folhas e conseqüentemente favorecendo a turgescência das mesmas (D'HALLUIN et al., 1993; HOPKINS, 1995). As plantas, quando expostas a diversos tipos de estresse ambiental, notadamente o hídrico, podem apresentar acúmulo de prolina, putrescina e poliaminas (FUMIS; PEDRAS, 2002).

Dentre os solutos envolvidos no processo de ajustamento osmótico, a prolina tem sido citada na literatura como sendo um aminoácido particularmente sensível ao estresse (HOPKINS, 1995, LARCHER, 2004). Em decorrência da sua importância no ajuste osmótico, a prolina é a molécula mais estudada em plantas submetidas a estresses abióticos (MADAN et al., 1995). De acordo com Machado Neto et al. (2004) o acúmulo de aminoácidos, como a concentração de prolina, pode ser utilizada para avaliar as alterações enzimáticas ocorridas como respostas bioquímicas para mudanças no ambiente tais como temperatura, déficit hídrico, encharcamento e salinidade.

Sob a influência do estresse, a síntese de proteínas é inibida e a degradação de proteínas é acelerada, o que leva a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres. Uma característica marcante de um distúrbio no metabolismo das proteínas é a mudança nas proporções dos aminoácidos e, freqüentemente, um aumento na concentração de prolina (LARCHER, 2004). Enquanto vários trabalhos indicam uma alta correlação entre o acúmulo de prolina e o aumento da tolerância à seca, outros sugerem que o acúmulo é simplesmente um efeito do estresse (D'HALLUIN et al., 1993; MADAN et al. 1995).

Fumis e Pedras (2002) estudando três regimes de umidade do solo, para duas cultivares de trigo em solo arenoso, observaram que em relação aos níveis de prolina, houve efeito significativo em todos os tratamentos nos quatro estádios de desenvolvimento das duas cultivares. Os menores valores foram observados no tratamento constantemente irrigado e aumentou medida que diminuiu

a umidade do solo. O aumento do déficit hídrico promoveu incremento nos teores de prolina nas folhas das plantas.

Marin et al. (2006) avaliaram a influência da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, no teor de prolina livre da parte aérea das cultivares de guandu, IAPAR 43-Aratã e IAC Fava Larga. Em condições de restrição hídrica severa, a cultivar IAC Fava Larga foi considerada tolerante, em virtude do maior acúmulo de prolina livre.

2.6 Manejo de Irrigação

Na maior parte do território brasileiro, a irrigação é uma prática suplementar, isto é, os totais anuais de precipitação pluvial são suficientes para satisfazer as necessidades hídricas da cultura, todavia, a distribuição irregular das chuvas propicia a ocorrência de períodos de estresse hídrico às plantas, acarretando quebras de produção (VIEIRA, 1991). Uma maior disponibilidade de água às plantas é essencial para o desenvolvimento das culturas em regiões que não apresentam boa distribuição das precipitações pluviais, pois regula o fator água de produção, não permitindo que a umidade do solo seja reduzida a níveis que ocasionem condições de déficit hídrico às plantas (CUNHA; BERGAMASCHI et al., 1992).

O clima é um dos principais fatores na determinação do volume de água evapotranspirada pelas culturas. Além dos fatores climáticos, a evapotranspiração também é influenciada pela própria cultura. O controle da irrigação envolve a determinação do tempo e da quantidade da água aplicada, pois, de forma ideal, a irrigação deverá compensar a evapotranspiração (RAVIV; BLOM, 2001). A evapotranspiração é definida por Pereira et al. (2002) como o processo simultâneo de transferência de água para a atmosfera por evaporação da água do solo e por transpiração das plantas. A evapotranspiração é o mesmo que consumo de água pelas plantas, se forem desprezadas as quantidades de água usadas nas atividades metabólicas.

Um dos métodos mais utilizados para estimativa da evapotranspiração (ET_o) é o método do tanque classe A, desenvolvido pelo Serviço Meteorológico Norte-Americano (U.S.W.B.), no qual mede-se o efeito integrado da radiação solar,

vento, temperatura e umidade relativa sobre a evaporação de uma superfície livre de água, onde a planta responde as mesmas variáveis climáticas (DOORENBOS; PRUITT, 1984; PEREIRA et al., 2002). Apresenta também facilidade de operação e custo relativamente baixo, além dos resultados satisfatórios para estimativa da demanda hídrica das culturas. Diversos autores utilizaram o Tanque Classe A para a determinação da lâmina de irrigação, tais como: Santana et al. (2004); Alves Júnior et al. (2005) e Melo et al. (2006).

Em práticas agrícolas de campo, a deficiência hídrica pode ser compensada com irrigação, porém por ser uma prática cara deve ser feita de maneira correta para se evitar o desperdício e não prejudicar o desenvolvimento da planta, já que o excesso de água no solo causa redução imediata na troca de gases entre a planta e o ambiente (ARMSTRONG et al., 1994). Este processo, conhecido como anoxia ou hipoxia, sofrido pelo sistema radicular, altera o metabolismo celular, provocando queda imediata na respiração das raízes, tanto em plantas tolerantes como nas intolerantes ao excesso de água (LIAO; LIN, 2001). De acordo com Gutiérrez (2006) este estresse ambiental promove a formação de etileno devido à privação de O_2 , levando a sintomas morfológicos e fisiológicos de situação de estresse. Pardos (2004) completa que os danos nos tecidos submetidos temporariamente ao encharcamento levam a disfunções enzimáticas e fechamento estomático.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do Experimento

A pesquisa foi conduzida na área experimental de Plantas Mediciniais da UNOESTE, no período de abril a setembro de 2007, em Presidente Prudente, – SP, latitude 22°07'04"S e longitude 51°22'05"W, e altitude de 435,5 m. O clima é, pela classificação de Köppen, Aw mesotérmico, com verões quentes e invernos secos. O solo é classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo, Eutrófico, de textura arenosa/média (EMBRAPA, 1999). Na Tabela 1 é apresentada a análise físico-química do solo realizada conforme Raij et al. (2001). O solo do experimento não recebeu a prática da adubação nem calagem por tratar-se de área comumente utilizada para plantio de olerícolas com saturação por bases próximo a 70% e teores de nutrientes adequados (RAIJ et al., 1996). De acordo com Corrêa Júnior et al. (1991) são escassas as informações sobre as exigências nutricionais de plantas medicinais, principalmente no Brasil.

TABELA 1 - Análise físico-química do solo

P	SO ₄ ⁻²	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	H+Al	Mn	Fe	Cu	Zn	B
--mg dm ⁻³ ----		-----mmol _c dm ⁻³ -----					-----mg dm ⁻³ -----				
36	8,0	1,8	19	14	0	19	16,1	23,2	1,3	0,6	0,13

pH	M.O.	SB	CTC	M	V	Areia	Silte	Argila	Classe
CaCl ₂	g dm ⁻³	--mmol _c dm ⁻³ ----		%	%	-----g kg ⁻¹ -----		Textural	
6,3	7	35	51	0	69	795,7	64,3	140,0	Arenosa

Siglas: M.O. – matéria orgânica; S.B. – soma de bases; CTC – capacidade de troca de cátions; M% - saturação por alumínio; VB% - saturação por bases.

3.2 Preparo das Mudas e Transplântio

As mudas de calêndula (*Calendula officinalis* L.) foram obtidas por sementeira em bandejas de polipropileno de 200 células, com 2 sementes por célula. Aos 20 DAS (dias após sementeira) as mudas atingiram uma altura de 8 cm, passando pelo processo de desbaste deixando-se uma planta por célula. As plantas permaneceram nas bandejas por mais 5 dias depois foram transportadas para copos de 300 mL contendo substrato onde permaneceram mais 15 dias em viveiro recebendo irrigação manual três vezes ao dia.

O solo da área foi preparado por gradagem, e em seguida, os canteiros foram erguidos manualmente, resultando em 20 parcelas de 2,25 m² (Figura 2), que foram separadas por uma barreira física de placas de eucatex, com 0,5 x 1,0 m, a fim de impedir a contaminação da umidade das parcelas. Na preparação dos canteiros foram aplicados 150 kg de húmus distribuindo-se 3 kg m⁻². O transplântio foi realizado em covas de 20 cm de profundidade com espaçamento de 0,30 x 0,50 m aos 40 DAS. As parcelas constaram de 15 plantas. Após o plantio, colocaram-se restos de silagem de capim napier, como cobertura orgânica. Durante o ciclo os tratamentos culturais realizados constaram de capina manual e controle de infestação de formigas utilizando iscas.

O experimento foi instalado em um delineamento experimental inteiramente casualizado, constando de quatro tratamentos de lâminas de irrigação baseadas na evaporação do tanque classe A (ECA), um dos métodos mais utilizados para estimativa da evapotranspiração (ET_o), onde mede-se o efeito integrado da radiação solar, vento, temperatura e umidade relativa sobre a evaporação de uma superfície livre de água, onde a planta responde as mesmas variáveis climáticas (DOORENBOS; PRUITT, 1984).

Os tratamentos foram: T1 – sem irrigação (0%ECA), T2 – 50% ECA, T3 – 100% ECA e T4 –150% ECA com cinco repetições. As lâminas de irrigação (equação 1) foram estimadas com base nas leituras realizadas diariamente no tanque classe A da estação meteorológica da UNOESTE, em Presidente Prudente, SP. Utilizou-se um irrigador manual com calibrações a cada 500 mL. A água foi distribuída de maneira uniforme para controle da lâmina por canteiro, diariamente no

período da manhã. As lâminas de irrigação (Equação 01) foram estimadas com base nas leituras realizadas diariamente.

$$h_i = ECA \cdot k_p \cdot k_c \cdot S \quad (01)$$

Sendo: h_i a lâmina de irrigação (L); ECA a evaporação do Tanque Classe A (mm); K_p o coeficiente do Tanque Classe A; K_c a coeficiente da cultura (ALLEN et al., 1998) e S a área do canteiro ($2,25 \text{ m}^2$).

Para acompanhamento do armazenamento de água no solo utilizou-se o balanço hídrico para controle da irrigação, o qual é uma adaptação do balanço hídrico climatológico seqüencial que permite o acompanhamento do armazenamento de água no solo em tempo real como descrito em Pereira et al. (2002).

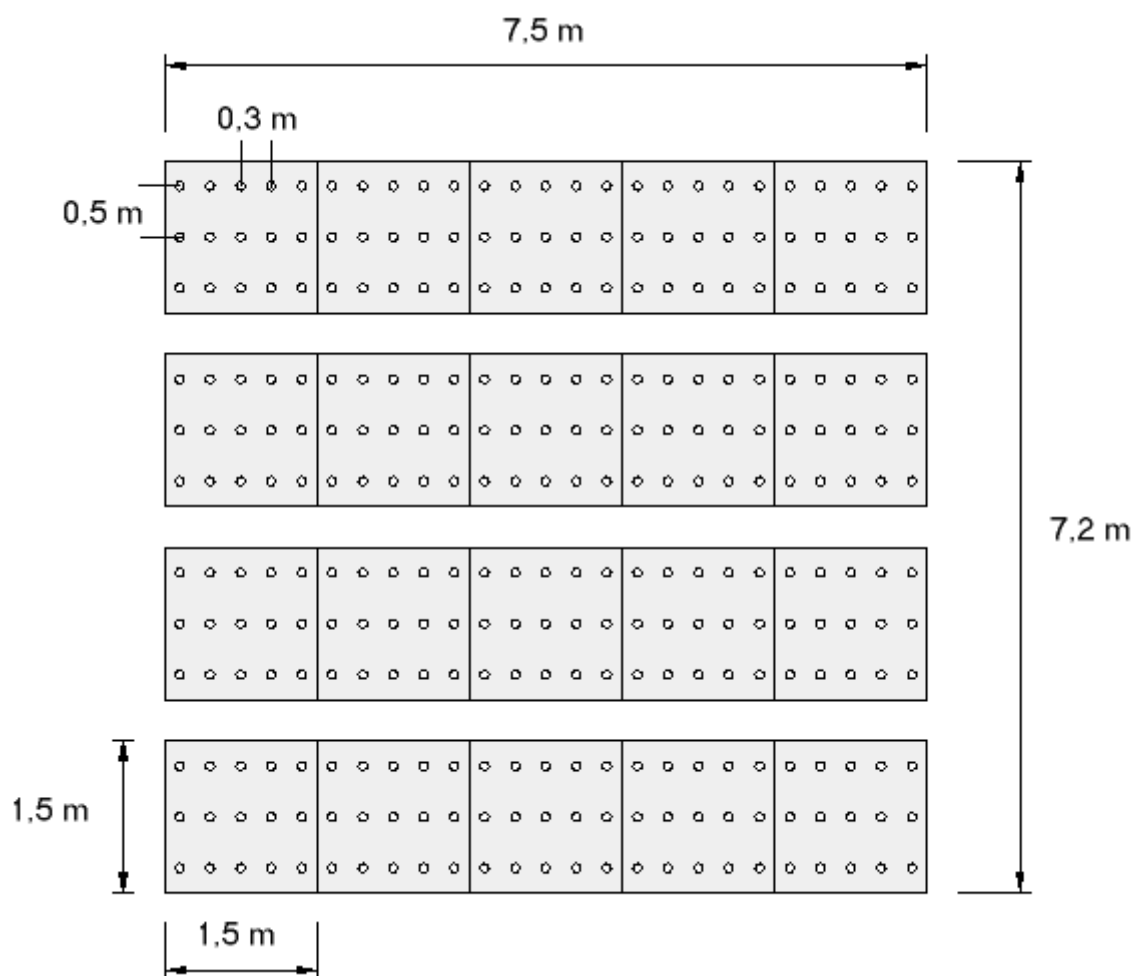


FIGURA 2 - Distribuição das plantas na área experimental

3.3 Colheitas e Análises Finais

A colheita da linha central foi iniciada após 60 dias do transplântio (DAT) com o surgimento das primeiras flores, sendo realizada duas vezes por semana até a senescência das plantas. Em cada colheita as flores foram contadas para a determinação do número de flores (NF). Em seguida foram secas em estufa com circulação de ar a temperatura constante de 40 graus até peso constante para a determinação da massa seca de flores (MSF). Na estufa as flores secas permaneceram armazenadas em papel Kraft até o momento da análise fitoquímica (evitando a interferência de luz e umidade).

Ao final do período de colheita (120 DAT), os valores de todas as colheitas foram somados obtendo-se NF (número de flores total); MSF (massa seca total de flores em g). As plantas foram coletadas inteiras e as raízes foram medidas com régua obtendo-se o comprimento da raiz (CR). Em seguida as raízes foram secas em estufa com circulação de ar a temperatura constante de 60 graus até peso constante obtendo-se a massa seca de raiz (MSR).

3.4 Teor de Flavonóides Totais

A dosagem de flavonóides foi realizada de acordo com Verlag (1978) modificado, utilizando-se quercetina como padrão, em solução de metanol (MeOH) e cloreto de alumínio. Dois gramas de material seco e pulverizado (capítulos) foram extraídos com 20 mL de MeOH 80% e aquecidos em banho-maria à 60° C. O extrato foi filtrado para um balão volumétrico de 50mL e repetiu-se a extração do resíduo duas vezes com 10mL de MeOH 80%, filtrando-se e reunindo os extratos no balão, sendo o volume completado para 50 mL com MeOH 80%. Em seguida, foi transferida uma alíquota de 5mL para um tubo de ensaio, adicionando-se 10mL de MeOH 100% e homogeneizando-se manualmente. Finalmente uma alíquota de 2mL é transferida para outro tubo de ensaio e acrescentada de 2ml de solução de cloreto de alumínio (5g de cloreto de alumínio em 100mL de água destilada) e 6mL de metanol 100%. Após repouso de 15 minutos, fez-se a leitura a 420 nm em

espectrofotômetro UV/visível Beckman DU 70 para se obter a concentração de flavonóides ($\mu\text{g mL}^{-1}$). A análise foi realizada em triplicata.

Os dados de absorvância das amostras foram comparados com uma curva-padrão construída a partir de soluções com concentrações crescentes de quercetina. A solução padrão de quercetina foi preparada com MeOH 100% numa concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Alíquotas de 1,0 mL ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 8 mL ($160 \mu\text{g mL}^{-1}$), com intervalos de 1,0mL foram utilizadas para a confecção da curva-padrão, acrescidas de 2mL de cloreto de alumínio e concentrações decrescentes de MeOH 100% de 8 mL a 1 mL. O rendimento do flavonóide total foi obtido pela multiplicação do teor pela massa seca de flores.

3.5 Teor de Prolina nas Folhas

A obtenção do teor de prolina nas folhas foi realizada de acordo com Bates et al. (1973) a partir de amostras de 500 mg de folhas frescas homogeneizada com 5 mL de ácido sulfosalicílico a 3% por cerca de dois minutos. A solução foi centrifugada a 6000 RPM por 900 segundos. Em tudo de ensaio contendo 2 mL do sobrenadante, adicionou-se 2 mL de ninidrina ácida (1,25 g de ninidrina, 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6 M (404,58 mL de H_3PO_4 85% em 1 L de água)) e 2 mL de ácido acético glacial. A estimativa do teor de prolina foi realizada pelo método colorimétrico em espectrofotômetro UV/visível Beckman DU 70, onde os dados de absorvância das amostras foram comparados com uma curva-padrão construída a partir de soluções com concentrações crescentes de prolina (0 a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Para as variáveis analisadas onde houve diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade as regressões para as lâminas de água foram calculadas pelo software Sisvar.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período estudado, no qual a planta permaneceu em campo, ocorreu uma precipitação efetiva de 200 mm, distribuídos no período de 16 a 22 de julho de 2008 (Figura 3). No restante do período não se observou precipitação efetiva. Na Figura 4 é apresentado o balanço hídrico mensal para o período de abril a setembro 2007, considerando a capacidade de retenção de água do solo (CAD) da região de Presidente Prudente, São Paulo de 100 mm. Neste balanço hídrico consta a indicação do período do florescimento no qual ocorreram as colheitas. A lâmina total de irrigação aplicada para cada tratamento foi de 0 mm; 59,5 mm; 119,00 mm e 178,5 mm para 0%ECA; 50% ECA; 100% ECA e 150% ECA respectivamente.

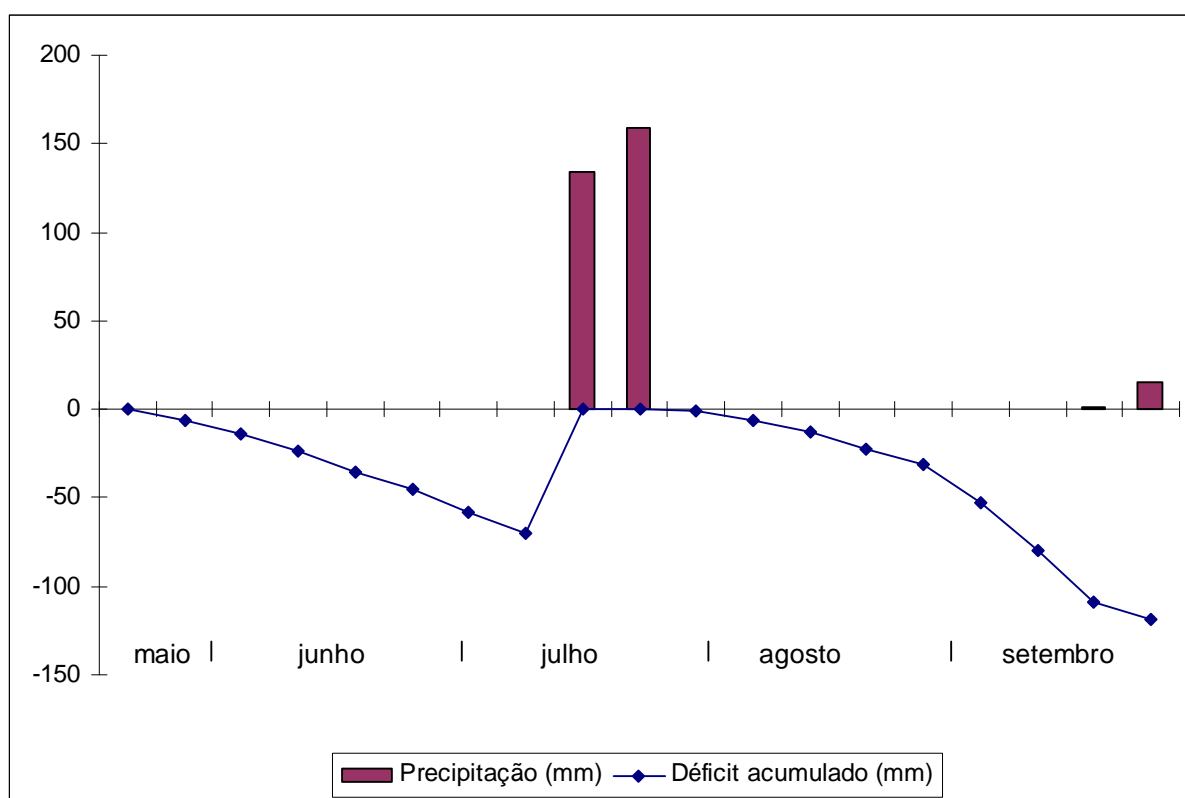


FIGURA 3 - Precipitação ocorrida no período e evapotranspiração acumulada para o tratamento sem irrigação

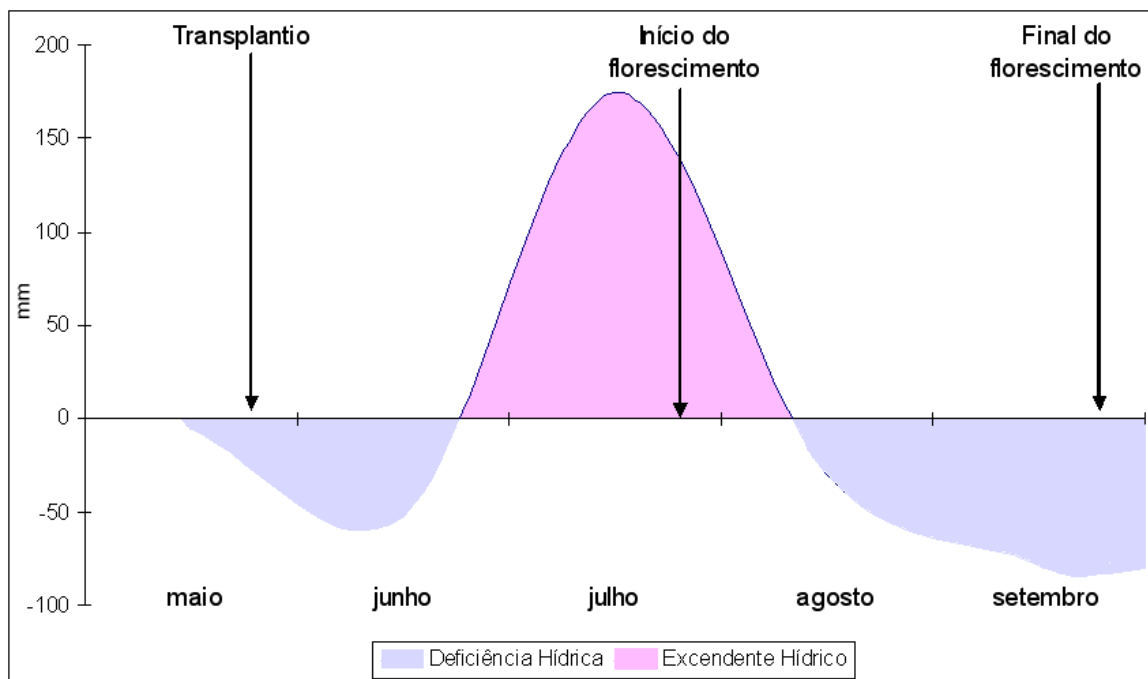


FIGURA 4 - Balanço hídrico para Presidente Prudente (maio a setembro de 2007)

As respostas da planta à escassez de água são complexas, envolvendo mudanças adaptativas e/ou efeitos deletérios. Sob condições de campo, estas respostas podem ser sinérgica ou antagonicamente modificadas pela imposição de outros estresses. As estratégias da planta para lidar com a seca normalmente envolvem uma mistura de mecanismos de tolerância e evitância, os quais variam com o genótipo. Entretanto, é a resposta integrada, isto é, ao nível da planta como um todo, a qual finalmente vai ditar a sobrevivência em um ambiente estressante. Essa resposta integrada inclui a assimilação de carbono e alocação de fotoassimilados para as diferentes partes da planta e também a habilidade reprodutiva da planta (CHAVES et al., 2002; LARCHER, 2004).

As lâminas de irrigação não proporcionaram efeito no comprimento da raiz (CR) (Figura 5A). Porém a massa seca de raiz (MSR) (Figura 5B) apresentou maiores valores para o tratamento sem irrigação. Este resultado era esperado pois plantas herbáceas anuais apresentam uma promoção do crescimento da massa radicular sob condições de déficit hídrico, enquanto que o crescimento da parte aérea mostra-se mais sensível.

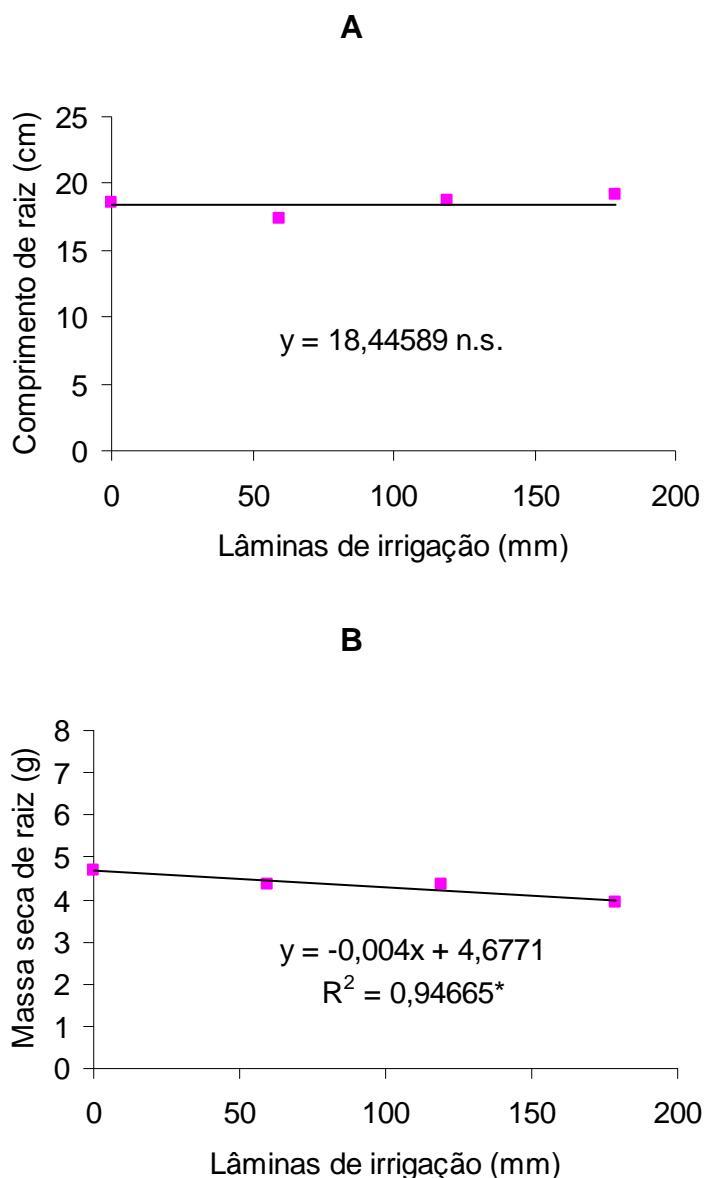


FIGURA 5 - Comprimento (A) e massa seca de raiz (B) de calêndula ao final do ciclo sob diferentes lâminas de irrigação

Nos tratamentos com 50% ECA (59,5 mm) houve uma deficiência hídrica leve, com reposição de parte da água perdida, sendo possível à planta encontrar água no solo. Quando a turgescência da planta começa a diminuir são iniciadas medidas osmorregulatórias. A combinação de síntese de compostos orgânicos nitrogenados e a conversão de amido para carboidratos solúveis ocasionam a acumulação de substâncias orgânicas de baixo peso molecular nos compartimentos celulares e no citosol, promovendo o influxo. Essas medidas ajudam na manutenção do volume celular e, assim, retardam a perda de turgescência no

mesofilo e nas células guarda, o que significa a manutenção por um tempo maior da abertura estomática e da assimilação, assim como a permanência do crescimento da raiz e conseqüente manutenção da absorção de água (LARCHER, 2004). Já para os tratamentos com 100% ECA (119,0 mm) e 150% ECA (178,5 mm) houve reposição total e excesso de água no solo, respectivamente, não implicando em promoção do crescimento radicular para busca de água no solo.

Uma das manifestações não específicas do estado de estresse, ou seja, independente da natureza do agente estressor é o aparecimento de substâncias osmoticamente ativas, como a prolina. De acordo com Larcher (2004), sob a influência do estresse, a síntese de proteínas é inibida e a degradação de proteínas é acelerada, o que leva a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres. Uma característica marcante de um distúrbio no metabolismo das proteínas é a mudança nas proporções dos aminoácidos e, freqüentemente, um aumento elevado na concentração de prolina. Na Figura 2 é apresentado o teor de prolina nas folhas da calêndula em função das diferentes lâminas de irrigação, determinado ao final do ciclo da cultura. Chaves et al. (2002) afirmam que plantas herbáceas de clima mediterrâneo, como a calêndula, apresentam relativa tolerância à desidratação de seus tecidos, levando a uma considerável resistência do aparato fotossintético à condição de seca, especialmente nas folhas mais jovens. Nestas folhas foi observado um maior acúmulo de açúcares solúveis, os quais podem atuar tanto como osmoprotetores ou como fonte de carbono para a manutenção da folha.

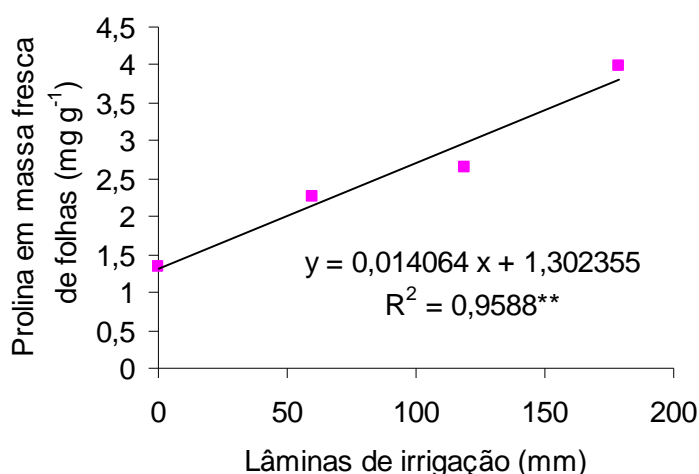


FIGURA 6 - Efeito das lâminas de irrigação no teor de prolina nas folhas da calêndula ao final do ciclo

O maior teor de prolina (Figura 6) foi encontrado com o estresse ambiental de excesso hídrico (150% ECA equivalente a 178,5 mm). Observa-se que o excesso de água aplicado diariamente prejudicou o desenvolvimento da cultura, análogo aos resultados obtidos por Pizard et al. (2006) para camomila e Silva et al. (2002) para *Melaleuca alternifolia*. Isto provavelmente ocorreu devido ao excesso diário de água no solo ter causado redução imediata na troca de gases entre a planta e o ambiente poder reduzindo o suprimento de oxigênio as raízes, o que em troca limitou a respiração, a absorção de nutrientes e outras funções das raízes (ARMSTRONG et al., 1994; HOPKINS, 1995; PARDOS, 2004).

Esperava-se que o tratamento sem irrigação (T1) também apresentasse alto teor de prolina como resposta ao lento desenvolvimento de deficiência hídrica que pode induzir ao ajustamento osmótico. Porém observou-se o menor teor de prolina neste tratamento, isto pode ser explicado devido a um provável desvio da rota metabólica ocorrido no período do pré-florescimento, devido à origem da planta. Isto foi desencadeado pela ocorrência da precipitação efetiva de 200 mm, a qual promoveu reposição hídrica no solo para todos os tratamentos.

Segundo Chaves et al. (2002), plantas herbáceas originárias de clima mediterrâneo, como a calêndula, estão preparadas para responder a mudanças climáticas bem definidas e apresentam relativa tolerância à desidratação de seus tecidos, levando a uma considerável resistência do aparato fotossintético à condição de seca, especialmente nas folhas mais jovens.

Sendo a calêndula uma planta de origem do Mediterrâneo está preparada para responder as mudanças climáticas bem definidas. Assim no decorrer do ciclo, o Tratamento 1 (sem irrigação – 0% ECA) esteve sob deficiência hídrica total o que sinalizou para a planta a possível morte por falta de água. Com a ocorrência da precipitação em julho, no período de pré-florescimento, a planta respondeu imediatamente com um florescimento abundante tanto em massa (Figura 7A) como em número de flores (Figura 7B) buscando a preservação da espécie. Resultados semelhantes foram obtidos por El-Din (2003) em anis (*Pimpinella anisum*), onde o déficit hídrico proporcionou a maior produção de frutos.

Tal acontecimento foi explicado por Taylor (1996), pois o acúmulo de prolina teria também a função de participar na constituição de um estoque de N e C que poderia ser utilizado depois do período de estresse. Furlan (1998) e Andrade e Casali (1999) explicam que na natureza observa-se que em períodos mais secos,

algumas espécies produzem maior quantidade de frutos para poder garantir sua perpetuação, mesmo em condições adversas. Meneses et al. (2006) define essa resposta como um dois mecanismos de resistência à seca conhecido como fuga da seca, a qual é definida como sendo a habilidade de uma planta de terminar seu ciclo de vida antes dos déficits hídrico críticos do solo. Este mecanismo envolve o desenvolvimento fenológico rápido (como florescimento e maturação precoce) e a plasticidade no desenvolvimento (variação na duração do período do crescimento dependendo da extensão do déficit hídrico).

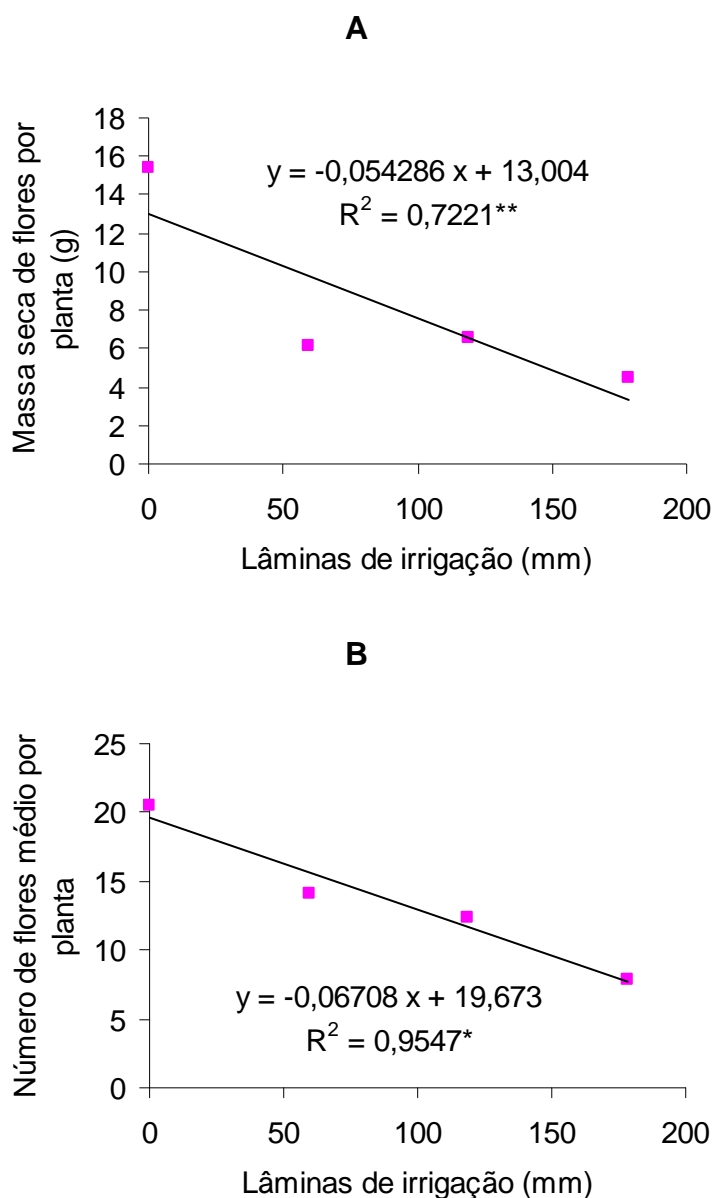


FIGURA 7 - Efeito das lâminas de irrigação no florescimento da calêndula

Distúrbios na região da raiz, como a deficiência hídrica, acarretam ajustes na distribuição de assimilados e na floração (“floração de emergência”), dentre outros (ANDRADE; CASALI, 1999; LARCHER, 2004). Dessa maneira, para o tratamento sem irrigação, a prolina que estava estocada nas plantas pode ter sido utilizada como fonte de N e C para o florescimento como explicado em Machado Neto et al. (2004).

Os maiores valores de florescimento (Figura 7A e 7B) foram encontrados no tratamento sem irrigação (15,4 g por planta, equivalente a 1026,68 kg ha⁻¹ de inflorescências secas). Esta produtividade está de acordo com os valores esperados de 720 kg ha⁻¹ de inflorescências secas, podendo chegar a 2000 kg ha⁻¹ citados por Montanari Júnior (2000). Os demais tratamentos apresentaram umidades crescentes no solo, assim a planta respondeu com florescimento no período esperado porém sem a necessidade de rápida e abundante produção de flores para garantir a reprodução da espécie. Os menores valores foram encontrados para o tratamento com estresse por excesso hídrico (150%ECA equivalente a 178,5mm) onde se observou uma produtividade de 4,51 g de inflorescência seca por planta equivalente a 301,16 kg ha⁻¹.

No que diz respeito ao efeito da água sobre a formação de compostos fenólicos na planta (entre eles, os flavonóides), pouco é sabido. Em geral, o estresse hídrico pode promover aumento na biossíntese de compostos fenólicos (MATERN; GRIMMIG, 1994). Alguns resultados demonstraram que os efeitos negativos nos teores de princípios ativos são devidos mais ao excesso de água do que à falta, pois algumas espécies, sofrendo estresse hídrico em determinadas fases da cultura, produziram mais substâncias do metabolismo secundário, propiciando a ação de defesa da planta (FURLAN, 1998; ANDRADE; CASALI 1999). Dessa maneira uma planta medicinal, cultivada sob a aplicação de diferentes quantidades de água, poderá apresentar alterações qualitativas e quantitativas no seu metabolismo secundário (CORRÊA JUNIOR et al., 1991; MONTANARI JUNIOR, 2000).

Para o teor de flavonóides (Figura 8A), as lâminas de irrigação não interferiram nos valores obtidos, ou seja, a variação da disponibilidade hídrica causada pelos tratamentos não interferiu no metabolismo secundário da planta. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Pacheco (2007), onde não houve diferença significativa entre diferentes intensidades de deficiência hídrica testadas (representadas por intervalos de interrupção da irrigação) e o tratamento controle

(plantas irrigadas) com relação ao teor de flavonóides totais em inflorescências de calêndula. Também Singh (2004), estudando alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sob diferentes regimes de irrigação, observou que a fração de reposição de água não interferiu no teor de óleo essencial.

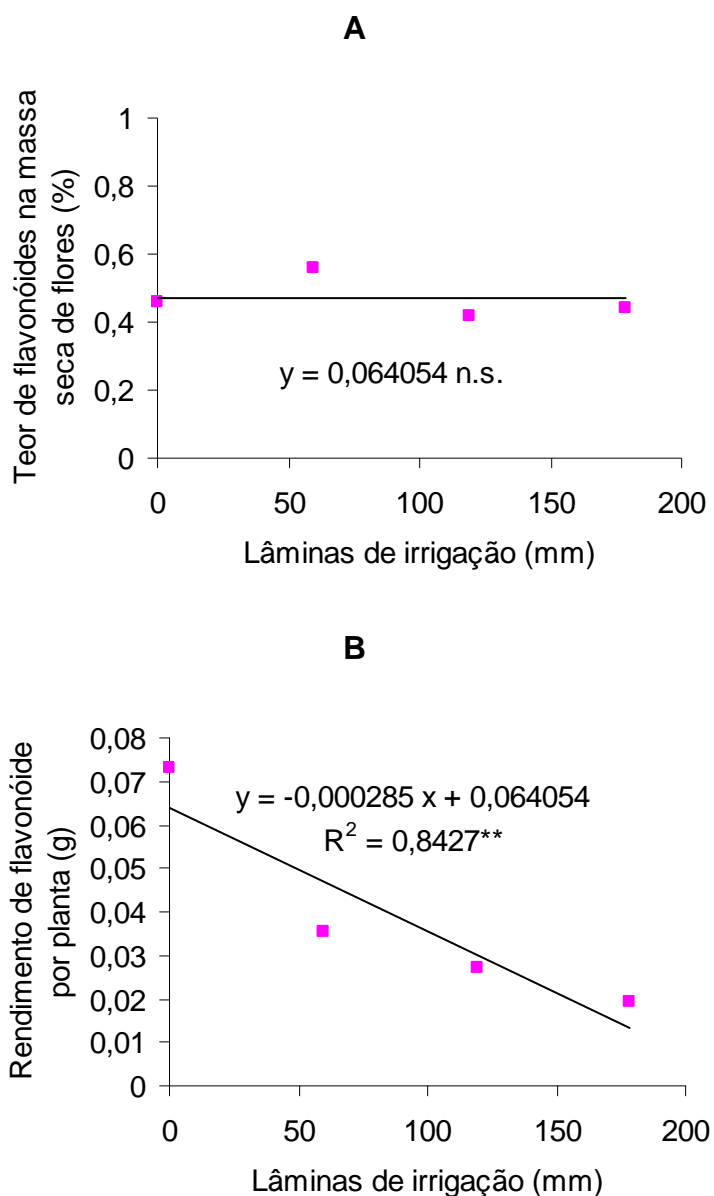


FIGURA 8 - Teor (A) e rendimento (B) de flavonóides para a calêndula sob diferentes lâminas de irrigação

Ao nível fisiológico, sugere-se que o estresse pode atuar redirecionando o carbono fixado fotossinteticamente da síntese de metabólitos

primários tais como celulose, lipídeos e proteínas (os quais são associados ao metabolismo de crescimento) para a síntese de metabólitos secundários como flavonóides e outros compostos fenólicos (com pouca ou nenhuma influência sobre o crescimento da planta), sob condições de estresses abióticos (KIRAKOSYAN et al., 2004; ABREU; MAZZAFERA, 2005). Assim, para a planta de calêndula, sugere-se que a variação na disponibilidade hídrica testada neste experimento não foi suficiente para promover esse redirecionamento do carbono fixado.

Como os tratamentos influenciaram significativamente a Massa seca das flores, o rendimento do flavonóide (Figura 8B) também apresentou resposta linear positiva, sendo o maior valor ($0,072 \text{ g planta}^{-1}$) obtido para o tratamento sem irrigação o menor ($0,0019 \text{ g planta}^{-1}$) para o tratamento com excesso hídrico (150%ECA equivalente a 178,5 mm).

5 CONCLUSÕES

- O teor de flavonóides não foi alterado em função das lâminas de irrigação.
- O maior teor de prolina foi obtido com o estresse hídrico por excedente hídrico.
- A produção de flores decresceu linearmente às lâminas de irrigação.
- Para as condições climáticas da região de Presidente Prudente no ano de 2007 o uso da irrigação para o plantio em maio não foi necessário;
- Deve ser realizada a irrigação, caso não ocorra precipitação, apenas no período de pré-florescimento com aproximadamente 200 mm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. N. ; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 241-248, 2005.

AHMED, A. A. M.; EL-HASSEN, G. M. Effect of water regime and cultivar on herbage yield and alkaloid content of *Catharanthus roseus*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 23, n. 3, p. 350-356, 2001.

ALVES JÚNIOR, J. et al. Produção de matéria verde em pupunheira irrigada. **Irriga**, v. 10, n. 4, p. 349-356, 2005.

ALLEN, R. G. et al. **Crop evapotranspiration: guidelines for computing crop water requirements**. Roma: FAO, 1998. 301 p. (irrigation and drainage Paper, 56).

ANDRADE, F. M. C ; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e Aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário**. Viçosa: UFV, 1999. 139 p.

ARMSTRONG, W. et al. Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Botanica Neerlandica**. v. 43, p. 307-358, 1994.

BATES, L. E. et al. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BILIA, A.R. et al. Stability of the constituents of calendula, milk-thistle and passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 3, p. 613-624, 2002.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. 2.ed. New York: Intercept, 2001. 1133 p.

CARVALHO, L. M. et al. Crescimento, teor de partenólídeo e de prolina em plantas. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 151-157, 2005.

CASTRO, P. R. C. et al. **Manual de Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. 651 p.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica, obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 47-75.

CORRÊA JÚNIOR, C. et al. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: EMATER-PR., 1991. 151 p.

CUNHA, G. R. da; BERGAMASCHI, H. Efeitos da disponibilidade hídrica sobre o rendimento das culturas. In: BERGAMASCHI, H. (Coord.). **Agrometeorologia aplicada à irrigação**. Porto Alegre : Editora da UFRGS, 1992. p. 85-97.

CHARTZOULAKIS, K.; DROSOS, N. Water requirements of greenhouse grown pepper under drip irrigation. **Acta Hortic.**, Wageningen, v. 1, n. 449, p. 175-180, 1997.

CHAVES, M. M. et al. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 7, p. 907-916, 2002.

D'HALLUIN, K. et al. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant Journal**, v. 4, p. 215-224, 1993.

DOORENBOS, J.; PRUITT, W. O. **Guidelines for predicting crop water requirements**. Rome: FAO. Irrigation and Drainage, 1984. 144p. (Paper, 24).

EL-DIN, A. A. E. Growth, yield and essential oil of anise in relation to water supply. **Annals of Agricultural Science**, v. 48, n. 2, p. 777-785, 2003.

EMBRAPA, **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa Produção de Informações (SPI), 1999. 412 p.

EMERENCIANO, V. P. et al. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 947-957, 2001.

FARIAS, M. F. **Manejo da irrigação na cultura do crisântemo (*Dendranthema grandiflorum ramat kitamura*) de corte cultivado em ambiente protegido**. 2006. 93 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Botucatu.

FUMIS, T. F.; PEDRAS, J. F. Variação o nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **PAB**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 449-453, abr. 2002.

FURLAN, M. R. **Cultivo de Plantas Mediciniais**. Cuiabá: SEBRAE, 1998. 137 p. (Coleção Agroindústria, v. 13).

GUTIÉRREZ, G. C. Muerta celular programada como respuesta al estrés ambiental. **Revista Chapingó**, v. 12, n. 2, p. 93-99, 2006.

HAMBURGUER, M. et al. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid ester from Marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoterapia**, v. 74, p. 328-338, 2003.

HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. 464 p.

KIRAKOSYAN, A. et al. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. **Physiologia Plantarum**, v. 121, p. 182-186, 2004.

KOUKI, M., MANETAS, Y. Resource availability affects differentially the levels of gallotannins and condensed tannins in *Cerotonia siliqua*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 7, p. 631-9, 2002.

KUMAR, A.; SINGH, D. P. Use of physiological indices as a screening technique for drought to tolerance in oilseed *Brassica* species. **Annals of Botany**, v. 81, p. 413-420, 1998.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa, 2004. 531 p.

LAVOLA, A. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. **Tree Physiology**, v. 18, n. 1, p. 53-8, 1998.

LAVOLA, A. et al. Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. **Physiologia Plantarum**, v. 109, n. 3, p. 260-7, 2000.

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceedings of the National Science Council**, v. 25, p. 148-157, 2001.

MACHADO NETO, N. B. et al. Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**, v. 4, p. 330-337, 2004.

MADAN, S. et al. Proline and proline metabolizing enzymes in in-vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. **Annals of Botany**, v. 76, p. 51-57, 1995.

MARCHESE, J. A., FIGUEIRA, G. M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 86-96, 2005.

MARIN, A. et al. Influence of water availability and soil acidity on the level of free proline in pigeon pea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 355-358, 2006.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000. 219 p.

MATERN, V.; GRIMMIG, B. Natural phenols as stress metabolites. **Acta Horticulturae**, n. 381, p. 448-462, 1994.

MELO, A. S. de et al. Vegetative development, fruits yield and optimization of pineapple cv. Pérola with different levels of irrigation. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 93-98, 2006.

MENESES, C. H. S. G. et al. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 10, n. 1/2, p. 1039-1072, 2006.

MING, L. C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 12, p. 3-9, 1994.

MONTANARI JUNIOR, I. Aspectos do cultivo comercial de calêndula. **Revista Agroecológica**, v. 1, n. 2, p. 24-25, 2000.

PACHECO, A. C. **Deficiência hídrica e aplicação de ABA sobre as trocas gasosas e o acúmulo de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.)**. 2007. 61 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PARDOS, J. A. Respuestas de las plantas al anegamiento del suelo. **Sistemas y Recursos Forestales**, p. 101-107, 2004.

PEREIRA A. R. et al. **Agrometeorologia**: fundamentos e aplicações práticas. Guaíba: Agropecuária, 2002. 478 p.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Rio de Janeiro: Edur, 2004. 191 p.

PIZARD, A. et al. Essential oil content and composition of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes. **Journal of Agronomy**, v. 5, n. 3, p. 451-455, 2006.

RAIJ, B. V.; et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: Instituto Agrônomo & Fundação IAC, 1996. 285 p. (Boletim técnico, 100).

RAIJ, B. V. et al. **Análise química para avaliação de fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto agrônomo, 2001. 285 p.

RAVIV, M.; BLOM T. J. The effect of water availability and quality on photosynthesis and productivity of soilless – grow cut roses. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 88, p. 257-276, 2001.

RODRIGUES, P. O. et al. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Acta Farm. Bonaerense**, Argentina, v. 23, n. 1, p. 27-31, 2004.

SANTANA, M. S. et al. Initial growth of two high-density coffee tree cultivars influenced by drip irrigation levels. **Engenharia Agrícola** v. 24, n. 3, p. 644-653, 2004.

SANTOS, T.T. et al. Efeito do estresse hídrico na produção de massa foliar e teor de óleo essencial em sambacaitá (*Hyptis pectinata* L.). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 44., 2004. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SOB, 2004. v. 22. p. 1-4.

SCHEFFER, M. C. Roteiro para estudo de aspectos agronômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUS-PR/CEMEPAR. **SOB Informa**, v. 11, n. 1, p. 29-31, 1992.

SHARP, H. et al. 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 105-7, 2001.

SILVA, S. R. S et al.. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

SINGH, M. Effects of plant spacing, fertilizer, modified urea material and irrigation regime on herbage, oil yield and oil quality of rosemary in semi-arid tropical conditions. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 411-415, 2004.

SINGH–SANGWAN, N. et al. Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. **New Phytologist**, v. 128, p. 173-179, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Art med, 2004. 719 p.

TAYLOR, C. B. Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 8, p. 1221-1224, 1996.

TOHGE, T. **MassBank Record: PR020080**. 2008. Disponível em: <www.massbank.jp/jsp/Dispatcher.jsp?type=disp&id=PR020080&site=1>. Acesso em: 02 jun. 2008.

VERLAG, D. A. **Deutsches Arzneibuch**. Gogi-Verlag GmbH: Stuttgart, Germany, 1978. 680 p.

VIDAL-OLLIVIER, E. et al. Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, v. 55; n. 1, p. 73-74, 1989.

VIEIRA, D. B. Irrigação de Citros. In: RODRIGUEZ, O. et al. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill., 1991. v. 2. p. 519–541.