



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – FANAT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS –
PPGCN



JOSÉ MARIA DAMASCENO SILVA NETO

EFLUENTE DA PISCICULTURA ALTERA A MORFOFISIOLOGIA E
BIOQUÍMICA DE *Lippia grata* (Verbenaceae)?

MOSSORÓ
2019

JOSÉ MARIA DAMASCENO SILVA NETO

EFLUENTE DA PISCICULTURA ALTERA A MORFOFISIOLOGIA E
BIOQUÍMICA DE *Lippia grata* (Verbenaceae)?

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN, como parte das exigências para obtenção do título de *Scientiae Magister* em Ciências Naturais/Área de concentração: Recursos Naturais (Linha de Pesquisa Tecnologia Ambiental).

Orientadora: Profa. Dra. Cynthia Calvalcanti de Albuquerque

Coorientadores: Profa. Dra. Marciana Bizerra de Morais

Prof. Dr. Nildo da Silva Dias - UFERSA

MOSSORÓ

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do(a) autor(a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu(a) respectivo(a) autor(a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Catálogo da Publicação na Fonte.
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

S586e Silva Neto, Jose Maria Damasceno
Efluente da Psicicultura Altera a Morfofisiologia e Bioquímica de *Lippia grata* (Verbenaceae)? / Jose Maria Damasceno Silva Neto. - Mossoró, 2019.
77p.

Orientador(a): Profa. Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais. 2. *Lippia grata*. 3. Estresse salino. 4. piscicultura. 5. sistema antioxidante. I. Albuquerque, Cynthia Cavalcanti de. II. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. III. Título.

JOSÉ MARIA DAMASCENO SILVA NETO

**EFLUENTE DA PISCICULTURA ALTERA A
MORFOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE *Lippia*
grata (Verbenaceae)?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN, como requisito parcial à obtenção do título de *Scientiae Magister* em Ciências Naturais/Linha de Pesquisa: Tecnologia Ambiental (Foco em Fisiologia do estresse e produção de metabólitos em plantas).

A reprodução e/ou utilização de quaisquer fragmentos textuais deste trabalho é lícito, contanto que as contribuições de todos os autores sejam consideradas, conforme os preceitos éticos e morais.

Aprovada em 15 de março de 2019

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque - (UERN)
Orientadora



Prof. Dr. Nildo da Silva Dias - (UFERSA)
Co-orientador



Prof. Dra. Lindomar Maria de Souza – (CETENE-PE)
Examinador externo

Ao presidente Lula pela ampliação da interiorização dos programas pós-graduação e por ter nos dado a oportunidade de sonhar.

OFEREÇO!

À minha mãe (Lourdinha) e minha vó (Josélia) que me ensinaram mais do que os livros e acreditaram que era possível, mesmo quando eu não acreditei.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por tudo que tenho e sou; por cuidar de mim em todos os momentos da minha vida, pelas boas pessoas que põe no meu caminho e pelas oportunidades que me proporcionou.

À minha mãe, **Maria de Lourdes Melo Damasceno**, que acreditou em mim mesmo quando eu não acreditei, me incentivou e desprende, diariamente, tempo da sua vida para cuidar de mim e do meu irmão. Te amo muito!

Aos meus avôs maternos, **José** (*in memoriam*) e **Joselia**, que são exemplos de perseverança, de fé e humanidade. Não sei o que seria de mim, se Deus não tivesse me presenteado com a presença de vocês em minha vida. É, foi e sempre será por vocês.

Aos meus irmãos, **Júnior, Beatriz e Sofia**, por todo amor, apoio e incentivo. Vocês são presentes de Deus.

A minha orientadora, **Prof^a Dra. Cynthia Calvancanti de Albuquerque**, pelo zelo, cuidado, carinho, compreensão e preocupação. A senhora é um exemplo de profissional e ser humano que sempre inspirará seu “filhotinho” (Risos).

A **Dra. Marciana Bizzera de Moraes** pela divisão de bancadas, orientações, conselhos, preocupação e amizade. Sem dúvidas alguma, conhecer uma pessoa com a leveza de espírito e o coração puro como o seu, me faz continuar na busca de melhorar diariamente. Muito obrigado!

Aos amigos e amigas que construí no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas (Prof^o Mayron, Josi, Isa, Marcos, Clara, Ellen, Dani, Larissa, Clever, Anny e Marcelo), por todo apoio durante a condução do experimento e nos momentos de bancada; pela parceria e momentos de descontração compartilhados. Sem vocês, nada teria sido possível. Minha eterna gratidão!

A **Adams Moraes Alves** pela sua amizade, companheirismo, carinho, preocupação e incentivo nessa fase de finalização de um ciclo tão importante na minha vida.

Ao **Prof^o Dr^o Nildo da Silva Dias** pelo fundamental apoio para a execução do experimento e nas análises de nutrientes.

Ao meu estimado amigo, **Francisco Fábio Mesquita de Oliveira**, pelas boas conversas compartilhadas que sempre serviam de inspiração para a construção melhor do meu trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Solo (Paula, Kaline, Valdete e Seu Elídio) pela boa receptividade, dicas e ajuda nas análises de nutrientes.

A **Profª Dra. Cláudia Ulisses**, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo acolhimento e oportunidade de realização das análises de anatomia.

A **Dra. Lindomar Maria de Souza** pela valiosa contribuição ao meu trabalho com as análises de anatomia e por se disponibilizar em participar da banca de avaliação do nosso trabalho.

A todo o corpo docente e direção do Centro de Educação Integrada Professor Eliseu Viana pela compreensão nos meus momentos de ausência para me dedicar ao mestrado.

Aos colegas do mestrado, de maneira especial, à Kaline Carvalho e Jesyka Guedes que compartilharam comigo momentos de angústia e alegria.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

À Fundação Brasil Cidadão, na pessoa da diretora executiva **Maria Leinad Vasconcelos Carbogim**, pelo incentivo e oportunidades que nos fizeram vislumbrar sonhos em nossa vida.

A todos os meus amigos que torcerem, me apoiaram e contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

“Se cheguei até aqui, foi por que me apoiei sobre ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

Aos citados nesse texto, minha eterna GRATIDÃO.

“O prazer de sonhar, de almejar algo inalcançável, move o ser humano, que mesmo sabendo que esses sonhos são utópicos, insiste em mantê-los como horizonte.”

(Aleff Ribeiro)

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar os mecanismos de resposta de *Lippia grata* irrigada com efluente salino proveniente de Piscicultura. Estacas de *Lippia grata* foram obtidas de plantas matrizes presentes na área de cultivo no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Universidade do Estado Rio Grande do Norte – UERN e submetidas a cinco níveis de condutividade elétrica (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}) durante 60 dias numa área experimental da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos e quatro repetições. Os níveis de salinidade das soluções composta por efluente e água de abastecimento não interferiu na produção de biomassa foliar e caulinar, no teor relativo de água e na área foliar da espécie estudada. A salinidade estimulou a quebra das reservas de amido pelo metabolismo da planta para a produção de açúcares redutores na tentativa de se osmorregular para os níveis de sal que estava sendo submetida. Os valores de prolina não diferiram estatisticamente entre o controle e os com o nível mais alto de efluente salino. Os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila a,b e carotenoides) não foram afetados nos níveis de salinidade. Os níveis de dano à membrana, conteúdo de MDA e H_2O_2 não diferiram estatisticamente entre os tratamentos indicando que a planta não apresentou sintoma de estresse à irrigação com o efluente. A atividade da SOD apresentou consonância com os níveis de H_2O_2 , inclusive no tratamento controle. Os valores de APX e CAT foram diferentes de acordo com o nível de salinidade. No tratamento 4 (75% do efluente salino) a atividade da CAT teve um pico de atividade. Enquanto que a APX, destacou-se no tratamento 2 (25% do efluente). A anatomia das seções transversais de folhas de *Lippia grata* mostram uma epiderme uniestratificada com inserção de tricomas glandulares e tectores nas faces adaxial e abaxial plantas que receberam somente efluente de piscicultura (T5) apresentaram na região da nervura central redução de 25% no número de feixes de xilema quando comparadas com as plantas do tratamento controle. O rendimento e composição química do óleo não diferiu entre os tratamentos. Dessa forma, o reuso do efluente de piscicultura na irrigação de *Lippia grata* demonstra ser uma alternativa viável, evitando-se o descarte do efluente no ambiente.

Palavras-chave: *Lippia grata*, estresse salino, piscicultura, sistema antioxidante, reuso.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the response mechanisms of *Lippia grata* irrigated with saline effluent from Pisciculture. *Lippia grata* cuttings were produced from matrix plants present in the cultivation area at the Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry of the State University of Rio Grande do Norte (UERN) and submitted to five levels of electrical conductivity (T1 = 452 μS , 2.68 dS m^{-1} ; T2 = 4.60 dS m^{-1} ; T3 = 5.55 dS m^{-1} ; T4 and T5 = 7.02 dS m^{-1}) for 60 days in an experimental area of the Federal Rural Semi-Arid University - UFRSA organized in a completely randomized design (DIC) with five treatments and four replicates. The different conditions of conductivity did not affect the leaf biomass production, the relative water content (TRA) and the leaf area of the species studied. The salt condition stimulated the breakdown of starch reserves by the plant metabolism for the production of reducing sugars in an attempt to osmoregulate to the levels of salt being submitted. The values of proline, important osmoregulator, did not statistically differ between the control treatment and the treatment with the highest level of saline effluent. The levels of photosynthetic pigments (chlorophyll a, b and carotenoids) were not affected by established treatments. MDA and H₂O₂ contents did not differ statistically between control and salinity levels, indicating that the plant presented no stress symptom to irrigation with the effluent. The SOD activity showed consonance as H₂O₂ levels, including in the control treatment. The APX and CAT values were different according to the salinity level. In treatment 4 (75% of the saline effluent) CAT activity had a peak activity. While the APX, stood out in treatment 2 (25% of the effluent). The anatomy of the transverse sections of leaves of *Lippia grata* show a unstratified epidermis with insertion of glandular trichomes and tectors in the adaxial and abaxial faces. Plants that received only pisciculture effluent (T5) presented in the region of the central vein a 25% reduction in the number of bundles of xylem when compared to control treatment plants. The yield and chemical composition of the oil did not differ between treatments. Thus, the reuse of the fish effluent in the *Lippia grata* irrigation proves to be a viable alternative, avoiding the discharge of the effluent into the environment.

Key words: *Lippia grata*, saline stress, fish farming, antioxidant system, reuse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies aquícolas cultivadas mais frequentemente no Brasil entre os anos de 2013-2015 (IBGE, 2016).....21

Figura 2 – Resposta das plantas ao estresse salino. Essa resposta é dividida em duas fases. A primeira (fase osmótica) quando a planta aclimata-se ao estresse; e a segunda (fase iônica), que ocorre com tempo maiores de exposição ao sal, ocasionando efeitos mais deletérios as estruturas celulares. (a) A linha verde rompida representa a resposta hipotética de uma planta com tolerância aumentada ao componente osmótico de estresse de salinidade. (b) A linha pontilhada se apresenta como a resposta de uma planta com maior tolerância ao componente iônico do estresse por salinidade. (c) A linha verde e vermelha representa a resposta de uma planta com maior tolerância aos componentes osmóticos e iônicos do estresse salino. (Fonte: Muns e Tester, 2008).....23

Figura 3 - O cloroplasto é o principal local de formação de oxigênio singlete, enquanto a geração de ROSs pela redução do oxigênio molecular ocorre em vários compartimentos celulares e extracelulares. Embora as ROS mitocondriais sejam mostradas sendo liberadas no citosol, elas também podem ser liberadas na matriz. (Fonte: Adaptado de NOCTOR et al, 2017).....25

Figura 4 - Árvore filogenética obtida através de dados qualitativos com as espécies do gênero *Lippia* separadas em quatro grupos (FONTE: O'LEARY, 2012).....29

Figura 5 - *Lippia grata*: (A) aspecto geral da planta; (B) detalhe da inflorescência; (C) brácteas apicais fundidas na inflorescência; (D) folha, superfície adaxial; (E) pubescência foliar, superfície abaxial; (F) pubescência foliar, superfície adaxial; (G) distribuição geográfica. (FONTE: O'LEARY, 2012).....30

Figura 6 - Déficit de pressão de vapor (DPV) ao longo de 60 dias experimentais na área de cultivo entre janeiro e fevereiro de 2018.32

Figura 7 – Efeito do efluente de piscicultura nos açúcares redutores (A), amido (B) e prolina (C) em plantas de *Lippia grata* (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....45

Figura 8 – Efeito do efluente de piscicultura no dano à membrana (%) (A), conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (B) e na peroxidação lipídica expressa pelo conteúdo de malondialdeído (MDA) (C) em plantas de *Lippia grata* (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....46

Figura 9 - Efeito do efluente de piscicultura na atividade de enzimas do metabolismo oxidativo superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em plantas de *Lippia grata* (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....47

Figura 10 - Fotomicrografias de cortes transversais de folhas de *Lippia grata* cultivadas sob irrigação de efluente de piscicultura. T1=452 μS (A-C); T2=2,68 dS m^{-1} (D-F); T3=4,60 dS m^{-1} (G-K); T4=5,55 dS m^{-1} ; (L-N); T5=7,02 dS m^{-1} (O-Q). Tt= Tricoma tector; Tg= Tricoma glandular; Xl= xilema; Fl= floema; Ep= epiderme; VA= Vasos auxiliares; Setas = Ráfides. (Escala = 50 μm).....48

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas do efluente de piscicultura (EP) e da água de abastecimento (AA) utilizado no experimento. Mossoró-RN, 2018.....33

Tabela 2 - Características químicas do solo da área experimental utilizada no experimento. Mossoró – RN, 2018.....34

Tabela 3 – Efeito do efluente de piscicultura na biomassa seca de folha (BSF), biomassa seca de caule (BSC) e teor relativo de água (TRA) e área foliar final (AFF) de plantas de *Lippia grata* (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....43

Tabela 4 – Efeito do efluente de piscicultura na clorofila a, b, total e carotenoides (mg.g^{-1} massa fresca) de plantas de *Lippia grata* (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....44

Tabela 5 - Efeito do efluente de piscicultura no número médio de feixes do xilema (NFX), vasos do xilema (NVX), vasos acessórios (NVA) e espessura do mesofilo (EM) em folhas de *Lippia grata* (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....49

Tabela 6 - Rendimento de óleo essencial de *Lippia grata* irrigada com efluente de piscicultura do cultivo de Tilápia do Nilo.....50

Tabela 7 - Constituintes presentes (%) no óleo essencial extraído de folhas de *L. gracillis* irrigadas com águas de rejeito de piscicultura com diferentes concentrações de salinidade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}).....51

Tabela 8 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de óleos essenciais extraídos de folhas de *L. grata* irrigadas com águas de rejeito de piscicultura com diferentes concentrações de salinidade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}).....53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1 A escassez água e as alternativas de reuso.....	19
2.2 Piscicultura: avanços e perspectivas.....	20
2.3 Salinidade e seus efeitos nas plantas.....	22
2.4 Estratégias fisiológicas, bioquímicas e anatômicas.....	25
2.5 <i>Lippia grata</i> SCHAUER.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Condições de cultivo, delineamento experimental e qualidade da água de irrigação.	31
3.2 Biomassa	34
3.3 Teor relativo de água (TRA)	35
3.4 Quantificação de malondialdeído (MDA) no tecido vegetal	36
3.5 Análise de Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	36
3.6 Extração de proteínas e teor de proteínas solúveis	37
3.7 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)	38
3.8 Atividade enzimática da catalase (CAT)	38
3.9 Atividade enzimática da Ascorbato Peroxidase (APX).....	38
3.10 Teor de amido	38
3.11 Determinação de açúcares redutores	39
3.12 Prolina	39
3.13 Análise de rendimento do óleo essencial (OE)	39
3.14 Análise anatômica das folhas	40
3.15 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) – Determinação de voláteis de óleo essencial	41

3.16 Cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (CG-DIC)	41
3.17 Atividade antibacteriana	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Biomassa, osmorreguladores e pigmentos	43
4.2 Estresse Oxidativo	45
4.3 Anatomia	47
4.4 Rendimento e composição química do óleo essencial	50
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÕES	60
<i>Referências.....</i>	61

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural essencial à vida e desempenha um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento da sociedade por estar intimamente ligada às atividades econômicas. Por sua necessária utilização, a água é consumida de forma descontrolada, sendo a atividade de irrigação a mais preocupante para o futuro dos recursos hídricos, pois demanda cerca de 70% de toda a água disponível no mundo. Apesar da exigência desse recurso pelo setor agrícola, o uso da água é fundamental para o aumento da produtividade alimentícia e consequente segurança alimentar. (ANA, 2017a).

Devido a baixa disponibilidade de água superficial no semiárido é necessário o desenvolvimento de alternativas economicamente viáveis, socialmente justas e ambientalmente corretas de convivência com o semiárido, como a reutilização de água proveniente da aquicultura. Este ramo de produção cresceu 87,1% na última década e tornou o pescado, a proteína animal de maior consumo pelos humanos, com cerca de 16,7% superior as demais carnes (bovino, suíno, ovino e caprino) (FAO, 2014). No Brasil a produção de peixes chegou a 199,5 mil toneladas em 2011, sendo as regiões Sul e Nordeste as maiores produtoras e dentre as espécies, a tilápia (*Oreochromis niloticus*) é o pescado produzido em maior frequência nos tanques de criação.

A demanda hídrica para a produção do pescado é elevada e diariamente são necessários uma reposição de 143,7 m³/ha de água em função da infiltração e evaporação dos viveiros. Estima-se uma demanda hídrica de 50 a 740.000 m³ para a produção de uma tonelada de pescado (OLIVEIRA; SANTOS, 2011). No processo de despesca, a quantidade de efluente é igualmente elevada e, quando o seu descarte ocorre nos corpos hídricos, pode causar eutrofização, reduzir e alterar a biodiversidade (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2009).

Nesse sentido, é necessário o desenvolvimento de alternativas que viabilizem a reutilização desses efluentes, porque apesar das limitações, contém compostos orgânicos e inorgânicos dissolvidos que podem ser utilizados em benefício da nutrição de plantas. Portanto, espécies tolerantes à salinidade e que sejam adaptadas às condições do semiárido são as mais indicadas para serem irrigadas com efluentes provenientes da piscicultura.

A salinidade do solo ou da água de irrigação podem causar estresse à maioria das plantas, o qual ocasiona o acúmulo de íons que perturbam o seu status nutricional, alterando a homeostase celular, em especial pelo acúmulo de Na^+ e Cl^- . Altas concentrações desses íons na célula causam danos as membranas e biomoléculas por meio da redução da hidratação. Dependendo do nível e do tempo de exposição, a salinidade ocasiona também o estresse oxidativo que causa na célula o acúmulo das espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas moléculas são produzidas naturalmente por processos metabólicos, por exemplo, a fotossíntese e respiração celular, entretanto, os níveis desses subprodutos são regulados pelo sistema antioxidante. Em condições de estresse o balanceamento entre a produção e regulação de espécies oxidantes é desequilibrado ocasionando o estresse oxidativo (TAIZ; ZEIGER, 2013). Embora estejam evidentes as alterações morfológicas e bioquímicas que plantas submetidas à salinidade sofrem, ainda são escassos os trabalhos sobre a influência desse estresse na produção de compostos naturais. Nesse contexto de produção de moléculas bioativas, as espécies pertencentes ao gênero *Lippia* destacam-se, pois grande parte é produtora de óleos essenciais com propriedades antimicrobianas comprovadas (ALBUQUERQUE et al, 2006; OLIVEIRA et al., 2008; FERNANDES et al., 2015) e, portanto, de interesse farmacológico.

Os trabalhos publicados com *L. grata* abrangem, principalmente, estudos dos efeitos do óleo e suas propriedades, porém, os registros acerca da influência dos estresses abióticos na composição e rendimento do óleo ainda são escassos. Além disso, os estudos são limitados a ambientes controlados, que não refletem o real comportamento da planta como é visto no campo. Levando em consideração que a espécie foco do estudo produz um óleo essencial com propriedade antimicrobiana e demonstrou tolerância à salinidade em trabalhos de casa de vegetação (RAGAGNIN et al, 2013; OLIVEIRA, 2015), desse modo faz-se importante viabilizar o plantio dessa espécie em áreas salinizadas. O uso dessa espécie nativa da caatinga oferecerá um produto que poderá ser comercializado nas indústrias químicas, sobretudo nas farmacêuticas. Essa ação poderá trazer para os pequenos, médios e grandes produtores novas possibilidades de renda.

A descoberta de novas possibilidades de cultivo de plantas nativas tolerante à salinidade e que mantenham seus compostos químicos potencialmente ativos abre perspectivas para o cultivo comercial de espécies com potencial farmacológico. Além disso, contribui para economia, o manejo e tratamento adequado dos solos do semiárido Nordeste.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Escassez hídrica e alternativas de reuso

A necessidade da aplicação da água para a geração dos bens de produção tem feito a demanda por este recurso natural crescer. O relatório das Organizações das Nações Unidas (ONU, 2015) alerta que a demanda hídrica crescerá 40% até o ano de 2030. Além disso, o crescimento populacional previsto até 2050 indica que a produção na agricultura precisará crescer mais de 100% para que possa suprir a necessidade populacional prevista.

Com este crescimento aumenta também a necessidade por uma maior quantidade de água para abastecimento das atividades, em função do crescimento da agricultura e a criação de novas indústrias (CUNHA, et al 2011). Esses fatores preocupam ainda mais as populações que vivem em regiões áridas e semiáridas, que compõem cerca de 47% da superfície do planeta, e possuem características climáticas e geológicas que ocasiona uma baixa pluviosidade e, por conseguinte, pouca disponibilidade de água (BARAKAT, 2009). Em nosso país esta situação ainda é mais severa em função da distribuição da população, que se concentra 45,5% nas regiões banhadas pelo Oceano Atlântico e disponibiliza nesta região apenas 2,7 % da água para consumo (ANA, 2015).

O atlas da irrigação elaborado pela Agência Nacional das Águas aponta que 47% da água retirada dos corpos de água no Brasil são destinados para a agricultura irrigada. À medida que é retirada do meio ambiente a água é consumida por evapotranspiração das plantas e evaporação do solo e, conseqüentemente, não está disponível para outras atividades em um curto espaço de tempo naquela região (ANA, 2017b). Dessa forma, é preciso assegurar a produtividade com o desenvolvimento de alternativas que garantam a segurança hídrica das regiões. Uma possibilidade que tem sido posto como viável é a reutilização de água.

O reuso de água é uma prática antiga já registrada nas antigas civilizações da Ilha de Creta na Grécia antiga há, em média, 3000 anos a.C (FELIZATTO, 2011). O reuso pode ser entendido como o aproveitamento de águas já utilizadas com o uso original ou de outra natureza (BREGA FILHO; MANCUSO, 2003). Dessa maneira, essa ferramenta contribui para a racionalização da água e pode torna-se um instrumento na gestão hídrica do país (BERNADI, 2003), uma vez que Política Nacional dos Recursos Hídricos

(PNRH), Lei nº 9443/97, institui em um dos objetivos “utilização racional e integrada dos recursos hídricos com vista no desenvolvimento sustentável”, no intuito de promover o uso múltiplo das águas e garantir uma maior eficiência hídrica.

O reuso de água segundo Mierzwa e Hespanhol (2005) pode ser classificado em dois segmentos: reuso direto de efluente, também conhecido como reuso em cascata, onde o efluente originado por alguma atividade é empregado em uma outra subsequente; reuso de efluentes tratados, no qual consiste na utilização de um efluente que já foi previamente submetido a algum tratamento. O primeiro segmento tem sido muito empregado nas atividades da aquicultura, especialmente em regiões áridas e semiáridas, de maneira integrada com a agricultura, proporcionando otimização de recursos e racionalização de água (OLIVEIRA; SANTOS, 2011). Além do que, o efluente proveniente da aquicultura quando reutilizado serve como suplementação da adubação, pode diminuir a deposição de matéria orgânica lançada nos corpos hídricos e reduzir a utilização de adubos químicos (SARIG, 1994; CORCORAN et al., 2010; LIBUTTI et al., 2018)

2.2 Piscicultura: avanços e perspectivas

O crescimento populacional tem feito com que a demanda por proteínas aumente para a manutenção da segurança alimentar da população. Dessa forma, o fortalecimento de atividades como a aquicultura serão fundamentais para suprir a necessidade existente (Referência).

A aquicultura é o cultivo de organismos aquáticos, tais como peixe (piscicultura), camarão (carcinicultura) e molusco (malacocultura), de interesse econômico em ambientes confinados e controlados (IPEA, 2017). Atualmente 540 milhões de pessoas em todo o mundo depende da atividade pesqueira e da aquicultura como fonte de renda e proteína empregada na alimentação (FAO, 2012), estando o Brasil como um propenso líder mundial na produção até o ano de 2030 (BRASIL, 2011).

No Brasil, a introdução da piscicultura teve seu marco inicial no começo da década de 70 pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) com espécies de Tilápias que objetivavam a criação de alevinos para o repovoamento dos reservatórios públicos, especialmente da região Nordeste. Naquele período, os empreendimentos não obtiveram o êxito esperado em função da inexperiência das técnicas de cultivo. No

entanto, a difusão tecnológica e o avanço das técnicas de manejo possibilitou o desenvolvimento de criadouros lucrativos, inicialmente no Paraná e depois difundido por outras regiões do território nacional. O avanço com as técnicas de manejo proporcionaram ao Brasil ocupar atualmente, segundo a FAO (2016), a 13ª colocação no ranking mundial de produção e o segundo maior país de produção da América Latina com 561 mil toneladas de pescado produzido, apontando como a proteína que mais cresce em produção no país.

De acordo como o IBGE (2016) a tilapiocultura é dentre dos segmentos da aquicultura o mais cultivado no Brasil, seguido do Tambaqui e Tambacu (Figura 1), respectivamente. O sucesso no cultivo de Tilápias deve-se as condições de adaptação da espécie, como a aceitabilidade a níveis mais elevados de sal, uma faixa de temperatura entre 24° C – 26° C que possibilita a adaptação em diversas regiões do país e um bom rendimento de peso (EMBRAPA, 2013; IPEA, 2016).

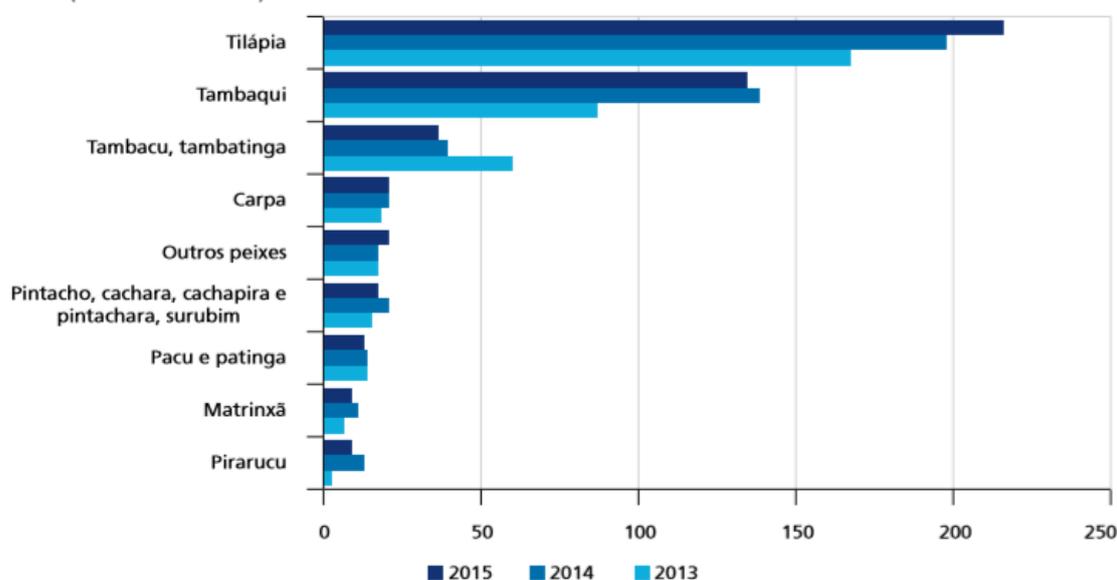


Figura 1 – Espécies aquícolas cultivadas mais frequentemente no Brasil entre os anos de 2013-2015 (IBGE, 2016).

O Nordeste é apontado como a região de maior importância para a produção nacional de piscicultura, responsável por produzir 26,8 % da produção Nacional (IBGE, 2016). Essa região abriga áreas salinizadas que concentram, mais especificamente em regiões de perímetro irrigados, um percentual de 57% da área total da região semiárida

(HOLANDA et al.,2007), que ocorre em função da pluviosidade insuficiente para a lavar os sais acumulados no solo (OLIVEIRA, 2008). Dessa maneira é necessário o desenvolvimento de uma visão integrada que possa desenvolver uma aquicultura voltada para as práticas sustentáveis e que garanta o crescimento da produtividade da aquicultura e, conseqüentemente, a segurança alimentar da população.

Com vista a suprir a carência hídrica de algumas regiões, a reutilização de efluentes com fins agrícolas cresceu consideravelmente nos últimos anos (KUMMER et al, 2012). O reuso é uma alternativa que supre parte do problema da insuficiência hídrica, favorece o desenvolvimento econômico, disponibiliza às culturas uma água rica em nutrientes e evita a deposição de um efluente rico em nitrogênio e fósforo que poderia contaminar águas superficiais, reduzindo a poluição ambiental. No entanto, para que se evite a salinização e poluição do ambiente é necessário antes do uso que sejam avaliadas: a concentração total de sais, a proporção relativa de sódio em relação a outros cátions, a concentração de elementos tóxicos, a concentrações de íons e condições microbiológicas (PHILIPPI JÚNIOR, 2003), para que se evite os efeitos deletérios em função da salinidade nas culturas.

2.3 Salinidade e seus efeitos nas plantas.

A salinidade é um dos fatores ambientais que mais reduz a produtividade das culturas, em função dos seus efeitos de natureza osmótica e iônica (MUNNS; TESTER, 2008). Este estresse ocasiona modificações no metabolismo das plantas, alterando as condições morfológicas e fisiológicas, restringindo o crescimento e produtividade dos vegetais. Em primeiro momento - fase osmótica - e com níveis moderados de sal, as plantas passam por um processo de aclimatação ao estresse salino desenvolvendo respostas, como por exemplo a restrição do transporte de água. No entanto, à medida que são acumulados íons salinos ao citosol das células as plantas começam a sofrer com processos de toxicidade - fase iônica – (Figura 2), tendo como processos mais ligados à esta fase a senescência e morte celular programada (SILVEIRA et al, 2010).

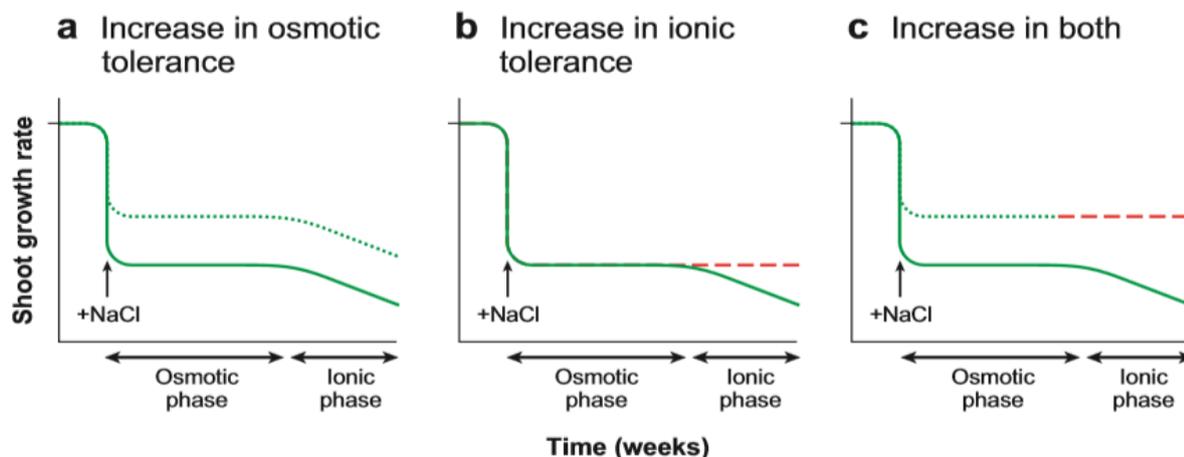


Figura 2. Resposta das plantas ao estresse salino. Essa resposta é dividida em duas fases. A primeira (fase osmótica) quando a planta aclimata-se ao estresse; e a segunda (fase iônica), que ocorre com tempo maior de exposição ao sal, ocasionando efeitos mais deletérios as estruturas celulares. (a) A linha verde rompida representa a resposta hipotética de uma planta com tolerância aumentada ao componente osmótico de estresse de salinidade. (b) A linha pontilhada se apresenta como a resposta de uma planta com maior tolerância ao componente iônico do estresse por salinidade. (c) A linha verde e vermelha representa a resposta de uma planta com maior tolerância aos componentes osmóticos e iônicos do estresse salino. (Fonte: Muns e Tester, 2008).

Os efeitos adversos da salinidade nas plantas refletem-se na taxa fotossintética, crescimento e desenvolvimento, em consequência de fatores osmóticos e iônicos (MUNNS; TESTER, 2008; HASEGAWA, 2013), Principalmente por inibir os processos fotossintéticos, de transpiração (TAIZ; ZEIGER, 2013), além disso, o acúmulo excessivo de íons sódio e cloreto nos cloroplastos afetam as reações bioquímicas e fisiológicas (ASHRAF; HARRIS, 2013). Esses efeitos são gerados em função do desequilíbrio redox da planta, o que gera uma excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Durante os processos metabólicos dependentes do oxigênio, como a respiração celular, fotossíntese e fotorrespiração, as ROS são geradas e o controle dessas moléculas é realizado através do sistema de defesa antioxidante. Em situações de estresse a produção de ROS nas plantas é intensificada, podendo desencadear o estresse em função de um desequilíbrio na homeostase celular e limitando os mecanismos de regulação (FOYER et al, 2017).

ROS é um termo genérico que engloba diversas moléculas como o oxigênio singlete (O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) que resultam das reações redox na célula (KOVALCHUK, 2010). A formação de ROS ocorre em processos metabólicos naturais, através do

desemparelhamento de elétrons durante a redução do oxigênio para a formação de moléculas de água (MITTLER, 2002).

As ROS diferem entre si quanto ao efeito sobre a célula. O radical superóxido é moderadamente reativo e instável. O superóxido afeta a atividade de enzimas que contêm metal, através da redução de quinonas e metais de transição. Entretanto, em uma série de reações, o superóxido é dismutado em peróxido de hidrogênio através da superóxido dismutase – SOD (LOCATO et al., 2010; BHATTACHARJEE, 2010). O peróxido de hidrogênio é formado massivamente nos peroxissomos pela redução de substratos orgânicos. Apesar de possuir uma reatividade moderada oferece perigo aos sistemas biológicos por conseguir atravessar as membranas biológicas. Além disso, participa da formação do $\text{OH}\cdot$, que é a ROS mais danosa aos sistemas biológicos. (SHARMA et al., 2012; KARUPPANAPANDIAN et al, 2011; BARBOSA et al, 2014).

O radical $\text{OH}\cdot$ é considerado a mais danosa e reativa ROS. Nos seres vivos ocasiona danos, mutações e inativação do DNA, danos aos carboidratos e inativação de proteínas por desnaturação; além de desencadear a perda de íons hidrogênio das cadeias de lipídios poli-insaturados, ocasionando a peroxidação lipídica (BARREIROS, 2006).

Estas moléculas afetam a atividade e funcionalidade da célula em eventos metabólicos que acontecem principalmente em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Figura 3) (BHATTACHARJEE, 2010).

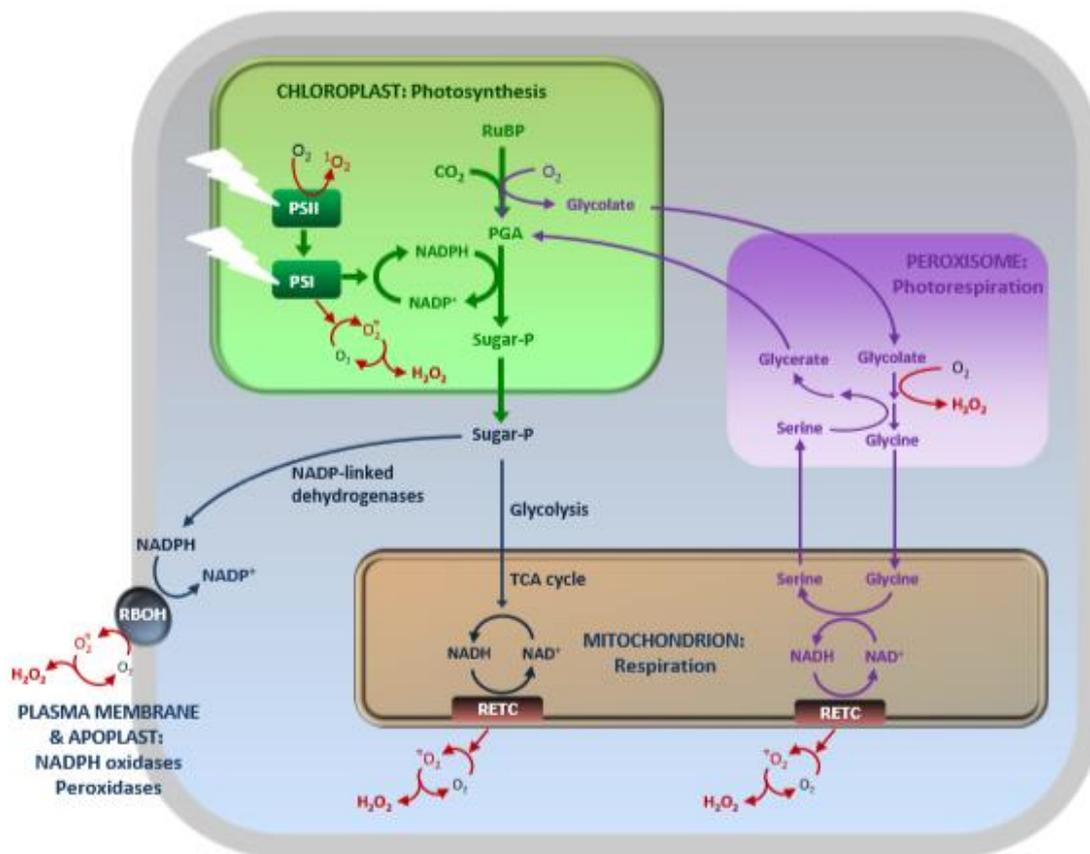


Figura 3. O cloroplasto é o principal local de formação de oxigênio singleto, enquanto a geração de ROS pela redução do oxigênio molecular ocorre em vários compartimentos celulares e extracelulares. Embora as ROS mitocondriais sejam mostradas sendo liberadas no citosol, elas também podem ser liberadas na matriz. (Fonte: Adaptado de NOCTOR et al, 2017)

2.4 Estratégias fisiológicas, bioquímicas e anatômicas.

Em situações de estresse, as plantas desenvolvem respostas fisiológicas e bioquímicas de adaptação (GOLDAK et al, 2014). Um dos mecanismos de resposta ao estresse refere-se à acumulação de solutos orgânicos de baixo peso molecular numa tentativa de ajustar osmoticamente a célula, manter sua turgência e equilibrar seu metabolismo celular. Dentre os osmorreguladores, os mais comumente produzidos são: açúcares solúveis, glicina betaína e, principalmente prolina (SHARP et al, 1990; GARG et al, 2002).

A prolina, um aminoácido de baixo peso molecular e elevada solubilidade, tem sua síntese aumentada em situações de estresse, pois é um importante regulador osmótico, protetor de membrana contra desidratação, dismutador de radicais livres e tampão para o pH citosólico e, portanto, é utilizada como indicador fisiológico de tolerância das plantas ao estresse (SILVEIRA et al, 2003). O processo de síntese de prolina já é um dissipador de energia, pois nesse processo, o glutamato, seu precursor, é reduzido a prolina pelas enzimas glutamato desidrogenase e pirrolina carboxilato redutase e ambas são dependentes de NADPH (IQBAL et al, 2013).

O efeito tóxico da sodicidade nas células é causado também por um alto influxo de íons Na^+ para o interior da célula. Este fenômeno causa um desequilíbrio iônico na relação Na^+/K^+ e prejudica a atividade enzimática citosólica, da fotossíntese e do metabolismo celular. Desta maneira, a planta precisa de mecanismos de tolerância à salinidade que equilibrem a relação entre esses dois íons no citosol e estabeleça o bom funcionamento da homeostase celular.

Um dos mecanismos mais aceitos de tolerância à salinidade é a exclusão do sal mediado por proteínas do grupo SOS, presentes na membrana plasmáticas. A SOS1 é uma proteína de membrana que atua como transportador de Na^+/H^+ do tipo antiporte que medeia o efluxo dos íons Na^+ para fora da célula (Via apoplástica) através de transporte ativo. A importância deste transportador é confirmada por Oh e colaboradores (2006) que avaliaram em plantas de *Arabidopsis* que haviam perdido o transportador SOS1 e ficaram sensíveis ao sal.

Outro mecanismo de tolerância ao estresse, consiste na compartimentalização vacuolar dos íons Na^+ . Esta estratégia diminui o potencial osmótico do citosol e mantém um alto índice de K^+ citosólico. O mecanismo consiste no sequestro do Na^+ citosólico através de transportadores NHX1 Na^+/K^+ antiporte. Além da compartimentalização do Na^+ no vacúolo, a célula possui estratégias de evitar o extravasamento dos íons do vacúolo com canais, como o FV (*fast activating*) e SV (*slow activating*) que controlam negativamente o efluxo de íons para o citosol (WU, 2016).

As plantas também respondem ao estresse salino com mecanismos de expressão de enzimas do seu sistema antioxidante e compostos antioxidantes não-enzimáticos (SZARKA et al., 2012). Esse complexo sistema antioxidante atua especialmente no combate às ROS geradas em situações de estresse abiótico das plantas

Os compostos antioxidantes não-enzimáticos estão presentes nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Dentre eles pode-se destacar o Ácido Ascórbico (AsA), que remove diversas ROS e participa junto com a Glutathiona (GSH) do ciclo do Ascorbato-Glutathiona no qual o H_2O_2 é eliminado mediante a oxidação do Asa (MITTLER, 2002; DINAKAR et al 2012).

Entre as enzimas do sistema antioxidante, destacam-se: SOD (Superóxido dismutase), APX (Ascorbato peroxidase) e CAT (Catalase) como as que possuem um papel crítico na desintoxicação dos ROS. As SODs são metalo-enzimas que atuam na primeira linha de defesa contra os radicais superóxidos (MITTLER, 2002). Para classifica-las são utilizados parâmetros com base em seus cofatores metálicos: ferro (Fe-SOD) cobre e zinco (Cu/ZnSOD), manganês (Mn-SOD) (GILL; TUJETA, 2010). As superóxidos dismutases atuam na dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ (superóxido) o que ocasiona a formação de outra ROS, o H_2O_2 (Equação 1).



Equação 1. Dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular.

A CAT e APX são duas proteínas importantes no controle do H_2O_2 (BHATT; TRIPATHI, 2011). A CAT atua nos peroxissomos, glioxissomos e, em menor quantidade, nas mitocôndrias. Esta enzima atua na conversão de duas moléculas de H_2O_2 , gerados durante a fotorrespiração e beta-oxidação, em moléculas de água e oxigênio molecular. Esta enzima é fundamental para o controle do estresse oxidativo, pois atuam especialmente quando as concentrações de peróxido estão elevadas (DUBEY, 2011). A APX é uma heme-proteína da superfamília das peroxidases que atua nas mitocôndrias e cloroplastos no ciclo da glutathiona-ascorbato, reduzindo o H_2O_2 à glutathiona. Ainda nos cloroplastos atuam na eliminação do H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$ gerados durante a fotorredução do oxigênio a água (LOCATO et al., 2010; ASADA, 2006).

Além desses mecanismos as plantas desenvolvem outros variados mecanismos em decorrência da salinidade como: super expressão de fitohormônios, em especial o ácido

abscísico (ABA) (KAZAN, 2015) e a lignificação dos tecidos vasculares, sobretudo xilema (DOLATABADIAN et al., 2011).

As adaptações e mecanismos aqui apresentados já foram elucidados em diversas espécies plantas, entretanto ainda é necessário estudos para esclarecer em outros grupos taxonômicos, especialmente àqueles que possuem interesse farmacológico, como é o caso de *Lippia grata*.

2.5 *Lippia grata* SCHAUER

Conhecida popularmente como alecrim-da-chapada e alecrim-de-tabuleiro, a espécie *Lippia grata* pertence à família Verbenaceae (Figura 4). É uma espécie endêmica do Nordeste do Brasil (GOMES et al., 2011) com distribuição na Floresta Tropical Seca, tendo ocorrência nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí, Bahia, Pernambuco e Paraíba (LORENZI; MATOS, 2002; MARRETO et al., 2008).

Baseados em estudos moleculares e anatômicos, O'Leary e colaboradores (2012), deram a essa espécie uma nova classificação, agora inserida no grupo B de *Lippia* Sección *Goniostachyum*, que compreende espécies sinônimas as *L. dumetorum* Herzog, *L. laxibracteata* Herzog, *L. gracilis* Schauer e *L. hickenii* (Figura 5).

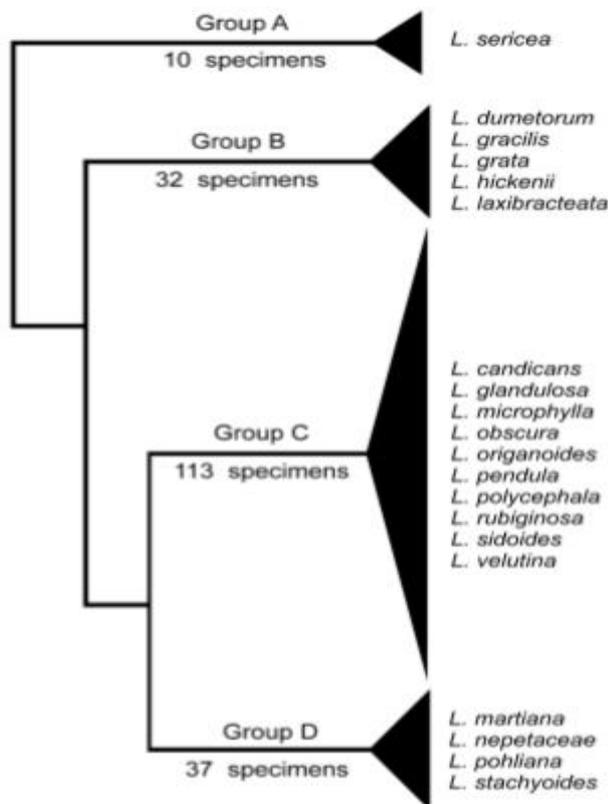


Figura 4. Árvore filogenética obtida através de dados qualitativos com as espécies do gênero *Lippia* separadas em quatro grupos (FONTE: O'LEARY, 2012).

L. grata caracteriza-se como um subarbusto de caule lenhoso (Figura 5) que varia de 1,2 a 3,0 metros de altura, inflorescências de coloração branca, frutos contendo um reduzido número de sementes, em sua maioria abortivas, e folhas aromáticas ricas em óleo essencial que é armazenado nos tricomas (MATOS et al., 2004; OLIVEIRA et al, 2011; TOZIN et al., 2015).

Resultante do metabolismo secundário e acumulado nos tricomas, o óleo essencial da *L. grata* possui um elevado teor de timol, carvacrol (ALBUQUERQUE et al., 2012; RAGAGNIN et al., 2014), p-cimeno e γ -terpineno, o que lhes confere um elevado potencial antimicrobiano (PEREIRA et al., 2008).

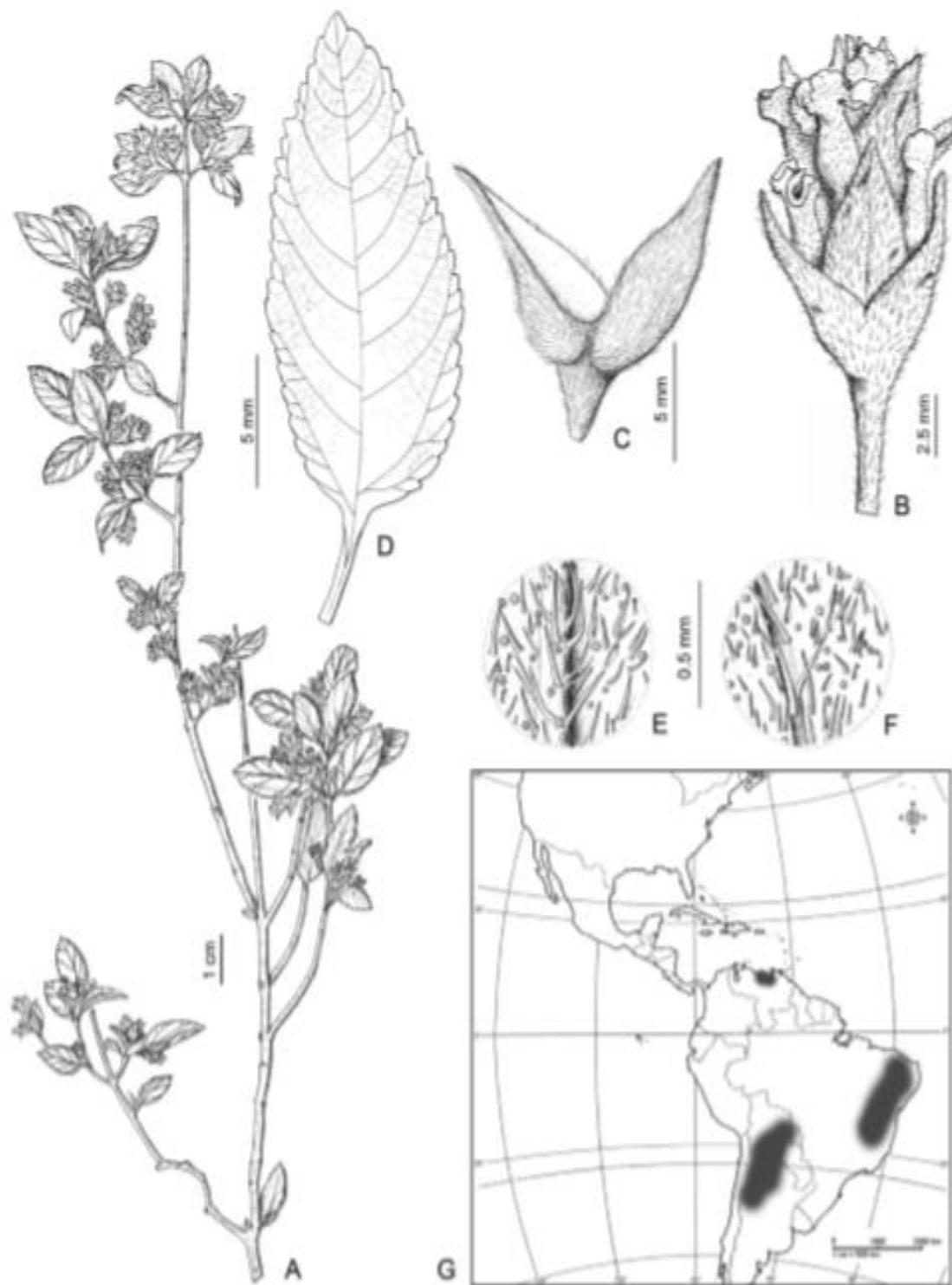


Figura 5. *Lippia grata*: (A) aspecto geral da planta; (B) detalhe da inflorescência; (C) brácteas apicais fundidas na inflorescência; (D) folha, superfície adaxial; (E) pubescência foliar, superfície abaxial; (F) pubescência foliar, superfície adaxial; (G) distribuição geográfica. (CTES). (FONTE: O'LEARY, 2012)

Inúmeros trabalhos mostram a eficiência da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia grata*. Em espécies de bactérias já foram comprovadas seu potencial inibitório em *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* e *Enterobacter hormeachei*. Além de seu potencial antimicrobiano, seu potencial antifúngico já foi testado em espécies como *Trichoderma viride*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusiccocum sp.* e *Penicillium sp.* (ALBUQUERQUE et al., 2006; FERNANDES et al., 2015).

Tendo em vista o seu potencial antimicrobiano já comprovado, por ter-se mostrado tolerante a salinidade, ser endêmica da região da caatinga e pela necessidade do desenvolvimento de alternativas que empreguem o reuso de efluentes, é fundamental o desenvolvimento de estudos que viabilizem o cultivo de plantas que apresentem um potencial promissor na venda de óleos, aplicável na geração de ciclos de cultivo de Tilápia da região semiárida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições de cultivo, delineamento experimental e qualidade da água de irrigação

O experimento foi conduzido em campo aberto numa área experimental de 90 m² pertencente ao Centro de Ciências Ambientais da Universidade Federal Rural do Semiárido - UFERSA, Mossoró – RN (5°12'02.4"S 37°19'37.3"O). As mudas de *L. grata* com 4 meses de idade foram transplantadas nas covas de plantio com 40 cm de profundidade, com espaçamento entre plantas de 1 m e entre linhas de 1, 10 m. Durante o período de aclimatização às condições de campo, cerca 90 dias, as mudas foram irrigadas diariamente com água de abastecimento. O déficit de pressão de vapor (Figura 6) foi calculado com base nos dados de temperatura do ar e umidade relativa (Tetens, 1930) da seguinte maneira

$$DPV = es - ea$$

Em que DPV é o déficit de pressão de vapor, es é a pressão de vapor saturado (kPa), e ea é a pressão de vapor real (kPa), que foi calculada usando as seguintes equações (Machado et al. 2016):

$$es = 0,611 * 10^{(7,5Tar / 237,3 + Tar)}$$

$$ea = (RH * es / 100)$$

em que Tar é a temperatura do ar ($^{\circ}C$) e RH é a umidade relativa do ar (%).

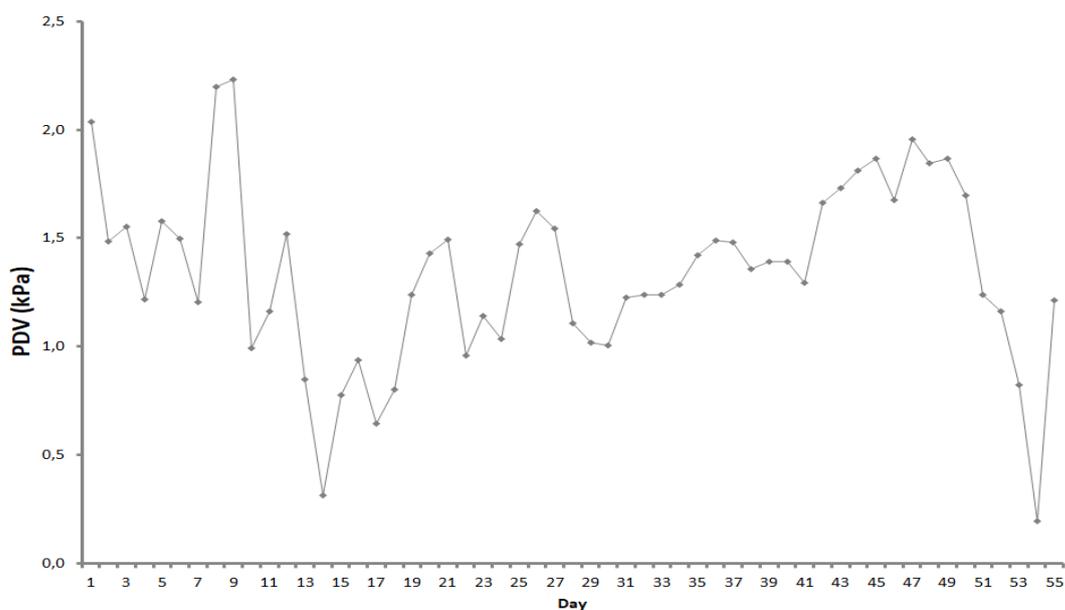


Figura 6. Déficit de pressão de vapor (DPV) ao longo de 60 dias experimentais na área de cultivo entre janeiro e fevereiro de 2018.

Após 90 dias da implantação em campo aplicou-se durante 60 dias as soluções com diferentes concentrações da água de rejeito salino do cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) obtida da área experimental do Departamento de Pesca da UFERSA, cuja composição química está na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas do efluente de piscicultura (EP) e da água de abastecimento (AA) utilizado no experimento. Mossoró-RN, 2018.

	pH	CE	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	RAS
Água	dS/M		----- mmolc/L -----						-----	-----
EP	7.30	7,02	2,0	44,91	15,10	25,70	52,80	0,00	3,80	9,9
AA	7.0	0,5	0,25	4,44	1,00	0,90	2,4	0,00	3,40	4,6

A irrigação foi realizada diariamente com a finalidade de manter o solo com a umidade à capacidade de campo. Cinco reservatórios para a água de irrigação, com capacidade para 500 L, foram instalados na área experimental. Para o abastecimento dos reservatórios, o efluente foi diluído com água em diferentes proporções até atingir à condutividade elétrica (CEs): 452 μS (controle – T1); 2,68 dS m^{-1} (T2), 4,60 dS m^{-1} (T3), 5,55 dS m^{-1} (T4) e 7,02 dS m^{-1} (T5), medidas com um condutivímetro digital (*Soil Control*, Inc.). Os níveis de umidade do solo tiveram como base a Capacidade de Campo (CC) nas parcelas irrigadas com água residual, bem como nas parcelas irrigadas com água de abastecimento.

A umidade do solo, foi obtida da curva de retenção de água do mesmo atualizando por tensiômetros instalados a até 30 cm de profundidade em cada parcela experimental, permitindo o cálculo do volume da irrigação em cada tratamento. Com base na curva de retenção de água do solo, fixou-se a tensão na capacidade de campo em 6 KPa (60 cm.c.a) correspondendo a umidade à CC em $0,1456 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3}$.

Foram realizadas coletas de amostras deformadas e indeformadas do solo nas profundidades de 0-15 cm, 15-30 cm e 30-45 cm, da área experimental e enviadas ao Laboratório de Física do Solo e para o Laboratório de Irrigação e Salinidade da Universidade Federal Rural do Semi-árido - UFERSA, onde foram realizadas, respectivamente, as análises físicas (Tabela 2), e a confecção da curva de retenção de

água no solo média para as profundidades consideradas, pela metodologia de Richards (1947), ajustada pelo modelo de Van Genuchten (1980)

Tabela 2 – Características químicas do solo da área experimental utilizada no experimento. Mossoró – RN, 2018.

AMOSTRAS	pH	CE	Mat.Org	P	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	(H+Al)	SB	t	CTC	V	m	PST
	(água)	ds/m	g/kg		mg/dm ³			cmolc/dm ³					%			
0-15 cm	8,16	132,10	-	6,0	82,2	98,9	2,20	1,97	0,00	0,00	4,81	4,81	4,81	100	0	9
15-30 cm	8,00	127,80	-	5,5	60,6	74,6	1,20	0,55	0,00	0,00	2,23	2,23	2,23	100	0	15
30-45 cm	8,10	182,60	-	5,6	76,8	978,2	1,58	0,92	0,00	0,00	6,95	6,95	6,95	100	0	61

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos (níveis de condutividade elétrica), com 4 repetições por tratamento. Após o período experimental, as plantas foram coletadas para análise. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e expressos em média e desvio padrão da média (Média ± DP, n=3).

3.2 Biomassa

Para obtenção de matéria seca, o material foi colhido, separado em caule e folhas, lavado, colocado em papel tipo Kraft e posto para secar em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C, até massa constante. A área foliar foi medida ao final do experimento por meio de imagens interpretadas pelo software Image J. Para esta variável foram coletados ramos da região mediana da planta, acondicionou-se em recipiente refrigerado e levou-se ao laboratório para o procedimento de leitura.

3.3 Teor relativo de água (TRA)

Em cada tratamento retirou-se um ramo da região central de cinco plantas, o qual foi acondicionado em gelo e transportado ao laboratório. Das folhas foram retirados 3 discos de diâmetro conhecido, com auxílio de um perfurador de rolha. Os discos foram imediatamente pesados em balança analítica para determinação do peso fresco e em seguida colocados em placa de Petri sobre papel de filtro embebido com água destilada. As placas foram postas em B.O.D a 25°C e 80% de umidade relativa, no escuro por 24h. Após esse período, os discos foram pesados novamente para determinação do peso túrgido e logo após foram colocados na estufa para secagem até peso constante. O peso seco foi determinado e o TRA foi calculado a partir da seguinte equação:

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

onde Pf = peso fresco; Pt = peso túrgido e Ps = peso seco.

Integridade da membrana (PIA e PIR) - A percentagem da integridade das membranas foi estimada a partir do extravasamento de eletrólitos (adaptado de AZEVEDO et al., 2008). Cinco discos foliares com diâmetro conhecido permaneceram imersos em 20 mL de água destilada, em tubos de ensaio, por 24 horas a 25 °C. Após esse período foi mensurada a condutividade elétrica livre (L1) com um condutivímetro portátil. Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria por uma hora a 100 °C para a realização da segunda leitura de condutividade elétrica (L2). O percentual de danos nas membranas (DM) foi estimado pela equação: %DM = (L1/L2) x 100. A partir do dano a membrana, foi calculada a percentagem de integridade absoluta (PIA), por meio da equação $PIA = 1 - L1/L2$ e percentagem de integridade relativa (PIR) que corresponde à razão entre a PIA de plantas sob estresse e a PIA de plantas do tratamento controle.

3.4 Quantificação de malondialdeído (MDA) no tecido vegetal

A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com Heath e Packer (1968), com modificações. A reação foi determinada através da produção de MDA, um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), a partir de leituras realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. O tecido vegetal foi macerado em TCA 0,1% juntamente com 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000g durante cinco minutos em temperatura de 4° C. Do sobrenadante foi retirado 0,25 mL e transferido para um eppendorf de 1,0 mL com solução contendo 0,5 de TBA e 20% TCA. A solução foi posta em banho-maria (95 °C) durante 30 minutos e, em seguida, foi resfriada por 10 min. Antes da leitura as amostras foram centrifugadas novamente por mais 10 minutos a 10.000 g.

3.5 Análise de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O peróxido foi mensurado segundo protocolo proposto por Alexieva et al. (2001). O material vegetal fresco foi macerado com ácido tricloroacético (TCA) 0,1% na relação de 1 g/10 mL (p:v). As amostras foram centrifugadas a 11.200 g por 15 min, a 4 °C. Do sobrenadante, foi retirado 200 µL ao qual foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de iodeto de potássio. As amostras foram mantidas em gelo e no escuro durante 60 min. Findado este período, as amostras foram retiradas do gelo e mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

3.6 Extração de proteínas e teor de proteínas solúveis

Amostras congeladas em nitrogênio líquido foram maceradas e homogeneizadas com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 1 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), 3 mM de DL-ditiotreitol e 20% de PVPP sob temperatura de - 4°C na relação de 1 g/3 mL (w:v) (Azevedo et al, 1998). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g durante 30 min e o sobrenadante separado em alíquotas e mantido armazenado a -20 °C até a determinação das atividades enzimáticas. A determinação do teor das proteínas solúveis totais foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (1976), utilizando-se de BSA (albumina do soro bovina) como padrão.

3.7 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

A SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Este método consiste na inibição do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando-se a formação do cromóforo. A solução consiste da mistura de 3 mL de tampão fosfato a 85mM (pH 7,8), 75 µM de NBT, 5 µM de riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM de EDTA e 50 µL do extrato enzimático. Esta solução foi posta em tubos de vidro e exposto a luz branca (lâmpada fluorescente) em uma caixa fechada coberta com papel alumínio, para refletir melhor a luminosidade em todo o ambiente, por 5 minutos. Após esse período, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 560 nm.

3.8 Atividade enzimática da catalase (CAT)

A catalase foi determinada pelo método de Havir e Mchale (1987). A solução foi preparada com 1 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mM em pH 7,5 e 25 µL de peróxido de hidrogênio a 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL da amostra sendo observada a reação de consumo do H₂O₂, durante 1 min. O acompanhamento da reação foi observado em espectrofotômetro a 240 nm a temperatura de 25 °C.

3.9 Atividade enzimática da Ascorbato Peroxidase (APX)

A atividade da APX foi determinada conforme método proposto por Nakano e Asada (1981). O meio de reação foi composto por 650 µL de tampão fosfato de potássio a 80 mM, pH 7,5, 100 µL de ascorbato a 5 mM, 100 µL de EDTA a 1 M, 100 µL de H₂O₂ a 1 mM e 50 µL do extrato protéico. A atividade da APX foi determinada pela taxa de oxidação do ascorbato durante 60 segundos, em espectrofotômetro a 290 nm sob temperatura de 30 °C.

3.10 Teor de amido

O teor de amido foi determinado pelo método colorimétrico padronizado por (APPENROTH et al., 2010). O material vegetal fresco foi macerado em HCl 18% (p/v), incubado a 5 °C por 1 hora. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 6682 rpm por 20 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada a uma de igual volume de lugol [KI 0,5% (p/v) e I₂ 0,25% (p/v) em água destilada] para determinação da absorbância a 530 e 605 nm. Os valores de absorbância foram aplicados na equação descrita para determinação do teor de amido.

3.11 Determinação de açúcares redutores

O método utilizado foi o colorimétrico do 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), descrito por MILLER (1959), utilizando na análise, 250 mg das amostras, diluído em água e adicionado o reagente DNS. A mistura foi mantida sob aquecimento em banho maria a 100 °C (em ebulição) durante 5 minutos, posteriormente resfriadas com banho de gelo, para determinação da absorvância do composto formado, em 540 nm. Para curva padrão da determinação espectrofotométrica dos açúcares redutores foi preparada com padrões de 1 g.L⁻¹ de glicose.

3.12 Prolina

O conteúdo de prolina foi determinado de acordo com o método proposto por Bates et al. (1973). A prolina foi extraída a partir de 0,3 g de amostra de folhas triturada em cadinho de porcelana com 10 mL de 3% de ácido sulfosalicílico. A mistura da reação foi extraída com 5,0 mL de tolueno e agitada durante 15 s em vórtex. Os tubos ficaram durante 20 min no escuro à temperatura ambiente para permitir a separação da fase aquosa do tolueno. A fase de tolueno foi recolhida e a absorvância medida a 520 nm em espectrofotômetro.

3.13 Análise de rendimento do óleo essencial (OE)

O processo de extração do OE foi realizado através do método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado. A biomassa vegetal foi determinada

previamente em balança analítica e em seguida as folhas foram colocadas em balão de fundo redondo com capacidade de 5L, contendo água destilada. O balão, acoplado ao aparelho de Clevenger modificado foi aquecido por uma manta aquecedora e a extração do óleo foi realizada pelo período de 2 horas, controlando-se a temperatura para aproximadamente, 100 °C. A partir da massa obtida na extração e da massa fresca do material vegetal, os teores dos óleos essenciais foram calculados a partir da seguinte equação: $TO = \frac{M_{\text{óleo}}}{M_{\text{folha}}} \times 100$, onde TO se refere ao teor de óleo; $M_{\text{óleo}}$ corresponde à massa do óleo, M_{folha} corresponde à massa fresca das folhas. O resultado está expresso em % (p/p).

3.14 Análise anatômica das folhas

Para a avaliação morfoanatômica da região mediana da lâmina foliar de *Lippia grata* foram confeccionadas lâminas a partir de material vegetal fixado em solução de FAA 70 e armazenados em álcool 70%. Os segmentos foliares foram desidratados em série alcoólica e incluídos em parafina (Johansen, 1940). Os cortes (5µm) foram realizados em micrótomo manual rotativo (Lupetec®, modelo MRP09), corados em solução de safranina e azul de alcian (Buskatsch, 1972) e montadas em Entellan®. Em seguida as lâminas foram fotografadas em microscópio óptico Top Light B2 (Bel®, videomicroscópio). As análises quantitativas foram realizadas através do programa ImageJ (Schneider et al. 2012). Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software Sisvar 5.6. (Ferreira, 2011).

*3.15 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) –
Determinação de voláteis de óleo essencial.*

A análise por CG-EM foi realizada em um instrumento Shimadzu modelo GC-2010 (quadrupolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna RTX-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Restek), modo de injeção com divisão de fluxo 1:100, gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, temperatura da linha de transferência de 250 °C e fonte de íons a 230 °C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C.min⁻¹ até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250 °C ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massas com aqueles presentes na base de dados fornecida pelo equipamento (NIST versão 2.0 de 2012 – 243.893 compostos), e de dados da literatura.

3.16 Cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (CG-DIC) -

A análise por CG-DIC foi realizada em um instrumento Shimadzu modelo GC-2010 Plus, coluna RTX-5 metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), modo de injeção com divisão de fluxo 1:30, gás carreador nitrogênio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹ (84,1 kPa) e velocidade linear constante de cm.s⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, temperatura do detector de 280°C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70°C com rampa de aquecimento de 4 °C.min⁻¹ até 180 °C por 27,5 min, seguida por rampa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ até 250 °C, ao término da corrida (34,5min). A identificação dos compostos foi realizada através da comparação dos seus índices de

retenção com os de compostos conhecidos, obtidos por injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos C₇-C₃₀, e de dados da literatura.

3.17 Atividade antibacteriana

Foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984; e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 11303 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Todas cepas padrão que integram o acervo da American Type Culture Collection (ATCC). As cepas bacterianas foram cultivadas em Agar Triptona de Soja (TSA; Liofilchem, Itália) e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o crescimento, algumas colônias isoladas foram removidas e inoculadas em 5 mL de Caldo de Triptona de Soja (TSB; Liofilchem, Itália), sendo o inóculo incubado a 37 °C por 24 horas. Em seguida, a concentração de células da cultura foi ajustada para 2×10^6 UFC/mL, através de turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial, foi determinada pelo ensaio de microdiluição em caldo em placas de poliestireno de 96 poços de acordo com as normas sugeridas pelo CLSI, (2017), com algumas modificações.

Inicialmente, 100 µL de cada óleo essencial, solubilizado em TSB, foi adicionado aos poços das placas de microtitulação em concentrações que variavam de 5 a 0,04 % e então 100 µL da suspensão bacteriana, previamente ajustada na concentração de 2×10^6 UFC/mL, foi adicionada nos poços. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C e posteriormente teve a densidade óptica de cada poço mensurado a um comprimento de onda de 620 nm com auxílio do leitor de microplacas (SpectraMax i3).

Considerou-se como CIM a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano. Para a determinação da CBM 24 horas após da incubação, foram removidos 10 µL da solução contida nos poços que não apresentaram crescimento microbiano, seguido de inoculação em placas de Petri com meio TSA e posterior incubação por 24 h a 37 °C. Após o período de 24 horas avaliou-se a presença de unidades formadoras de colônias (UFC) e considerou-se como CBM, a menor concentração da substância teste que inibiu o crescimento de UFCs nas placas.

4 RESULTADOS

4.1 Biomassa, osmorreguladores e pigmentos

As proporções de efluente na água de irrigação não influenciou de forma significativa ($p < 0,05$) nas variáveis biomassa seca das folhas e caule e TRA (Tabela 3). O TRA das folhas variou em média de 64 a 72%. No geral, as plantas de todos os tratamentos apresentaram aspecto vigoroso, sem sinais de danos e senescência

Tabela 3 – Efeito do efluente de piscicultura na biomassa seca de folha (BSF), biomassa seca de caule (BSC) e teor relativo de água (TRA) e área foliar final (AFF) de plantas de *Lippia grata* (T1=452 µS; 2,68 dS m⁻¹; T2=4,60 dS m⁻¹; T3= 5,55 dS m⁻¹; T4 e T5=7,02 dS m⁻¹).

Tratamentos	BSF (mg)	BSC (mg)	TRA (%)	AF (cm ³)
T1	67.17 ± 2.99 a	159.13 ± 4.18 a	67.24 ± 1.51 a	5.487 ± 337 a
T2	69.52 ± 4.38 a	169.30 ± 9.34 a	68.80 ± 1.82 a	5.296 ± 178 a
T3	61.97 ± 3.13 a	160.70 ± 4.74 a	68.95 ± 0.63 a	4.752 ± 349 a
T4	71.21 ± 4.14 a	175.60 ± 9.35 a	71.65 ± 1.85 a	4.986 ± 356 a
T5	69.95 ± 2.93 a	186.33 ± 8.03 a	71.76 ± 0.82 a	5.897 ± 657 a
CV	26.86	20.29	7.59	17.76

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados dos pigmentos cloroplastidiais indicam que o aparato fotoquímico não foi danificado pela variação da condutividade elétrica (Tabela 4), fato considerado importante para o desenvolvimento de plantas submetidas a estresse abiótico.

Tabela 4 – Efeito do efluente de piscicultura na clorofila a, b, total e carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca) de plantas de *Lippia grata* (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3=5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}).

Tratamentos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ massa fresca)	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Carotenoides
T1	0.469 \pm 0.01 a	0.717 \pm 0.10 a	1.181 \pm 0.09 a	302.00 \pm 14.83 a
T2	0.454 \pm 0.01 a	0.569 \pm 0.02 a	1019 \pm 0.02 a	288.92 \pm 4.27 a
T3	0.320 \pm 0.05 a	0.611 \pm 0.07 a	0.927 \pm 0.06 a	302.71 \pm 33.98 a
T4	0.442 \pm 0.02 a	0.523 \pm 0.04 a	0.962 \pm 0.03 a	269.49 \pm 12.36 a
T5	0.313 \pm 0.01 a	0.577 \pm 0.03 a	0.886 \pm 0.06 a	283.47 \pm 4.00 a
CV	24.05	18.78	13.33	28.04

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os níveis de açúcares redutores diferiram com a salinidade do efluente. Nos tratamentos 2 e 3 foi observado uma maior produção de açúcar; enquanto na salinidade mais alta, os níveis de açúcares foram menores (Figura 7A). Em contrapartida, o teor de amido diminuiu progressivamente (Figura 7B) quando aumentou-se a salinidade do efluente, com reduções que variaram de 37 a 19% nos tratamentos controle e T5, respectivamente. Já o conteúdo de prolina, importante osmorregulador em situações de estresse, foi estatisticamente inferior apenas no nível maior de sal (Figura 7C).

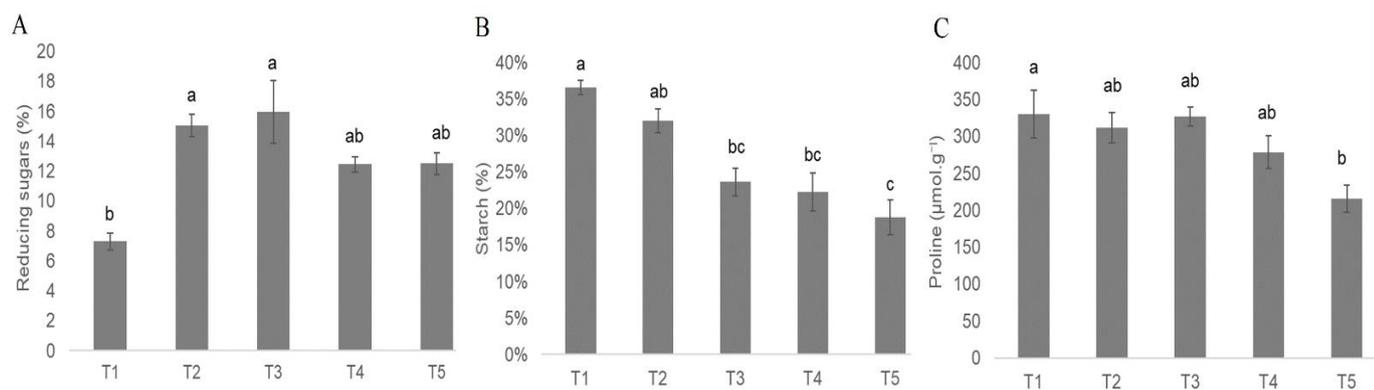


Figura 7 – Efeito do efluente de piscicultura nos açúcares redutores (A), amido (B) e prolina (C) em plantas de *Lippia grata* (T1=452 µS; 2,68 dS m⁻¹; T2=4,60 dS m⁻¹; T3=5,55 dS m⁻¹; T4 e T5=7,02 dS m⁻¹). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 Estresse Oxidativo

Não foi detectado nos tecidos foliares das plantas de *Lippia grata* incrementos no percentual de danos à membrana, igualmente acompanhado pela manutenção do teor do malondialdeído (MDA), produto da peroxidação de ácidos graxos polinsaturados de biomembranas (Figura 8A e B). Entretanto, verifica-se aumento dos teores de H₂O₂ com elevações significativas ($p < 0,05$) em todos os níveis de salinidade do efluente em relação ao controle.

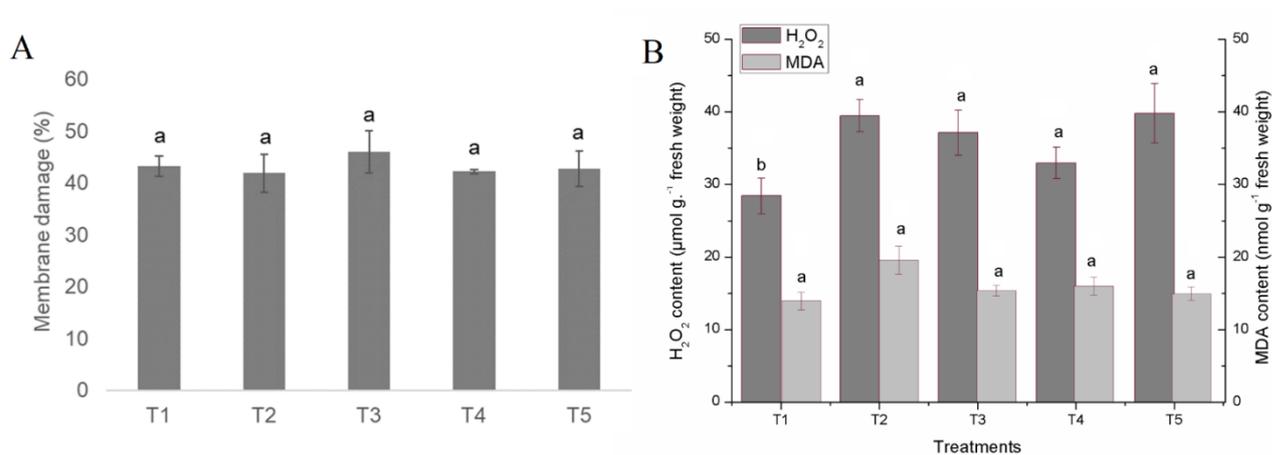


Figura 8 – Efeito do efluente de piscicultura no dano à membrana (%) (A), conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B) e na peroxidação lipídica expressa pelo conteúdo de malondialdeído (MDA) em plantas de *Lippia grata* (T1=452 μS; 2,68 dS m⁻¹; T2=4,60 dS m⁻¹; T3= 5,55 dS m⁻¹; T4 e T5=7,02 dS m⁻¹). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O sistema enzimático antioxidante, representado pela atividade das enzimas SOD, APX e CAT, apresentou diferenças significativas com a salinidade do efluente da piscicultura. Foi observada a manutenção das atividades de SOD, geradora de H₂O₂, paralelo a um aumento de APX e ou CAT. Essas respostas antioxidativas foram suficientes para a manutenção dos níveis de MDA em todos os tratamentos (Figura 9). O aumento no teor de H₂O₂ observado sugere geração dessa ROS a partir de outros processos metabólicos.

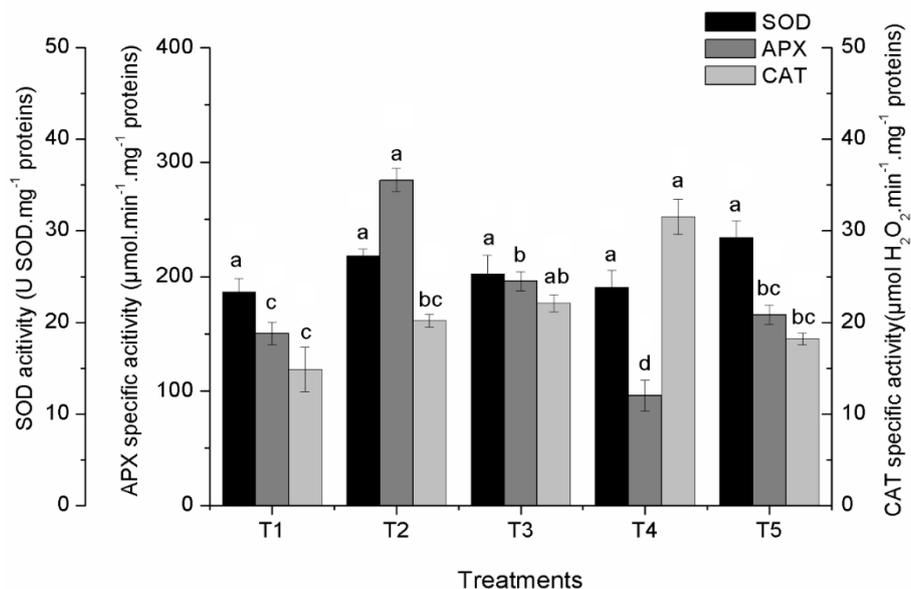


Figura 9 - Efeito do efluente de piscicultura na atividade de enzimas do metabolismo oxidativo superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em plantas de *Lippia grata* (T1=452 μ S; 2,68 dS m⁻¹; T2=4,60 dS m⁻¹; T3= 5,55 dS m⁻¹; T4 e T5=7,02 dS m⁻¹). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Anatomia

As seções transversais de folhas de *Lippia grata* mostram uma epiderme uniestratificada com inserção de tricomas glandulares e tectores nas faces adaxial e abaxial. O mesofilo é dorsiventral, com o parênquima paliçádico envolvendo o sistema vascular, o qual, presente na nervura central foliar apresenta o formato de meia lua (Figura 10). Além disso, foi verificada a presença ráfides nas células parenquimáticas, sugerindo a presença de um composto rico em cálcio, provavelmente o oxalato, em todos os tratamentos estudados (Figura 10F e P).

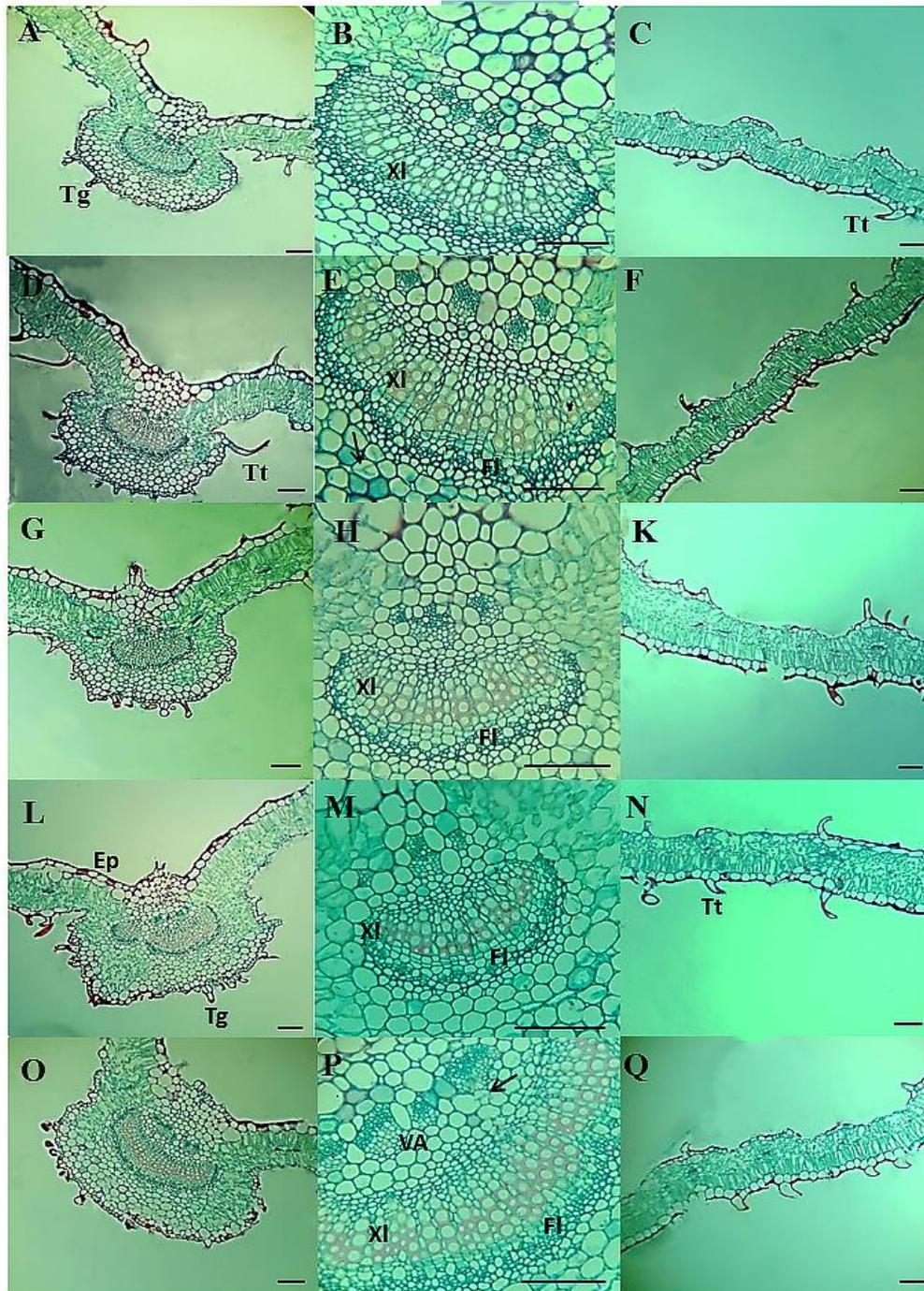


Figura 10. Fotomicrografias de cortes transversais de folhas de *Lippia grata* cultivadas sob irrigação de efluente de piscicultura. T1=452 μS (A-C); T2=2,68 dS m^{-1} (D-F); T3=4,60 dS m^{-1} (G-K); T4=5,55 dS m^{-1} ; (L-N); T5=7,02 dS m^{-1} (O-Q). Tt= Tricoma tector; Tg= Tricoma glandular; Xl= xilema; Fl= floema; Ep= epiderme; VA= Vasos auxiliares; Setas = Ráfides. (Escala = 50 μm).

O número de vasos auxiliares (NVA) nas folhas das plantas submetidas a diferentes concentrações do efluente não diferiu entre os tratamentos (Tabela 5). Neste aspecto, as plantas que receberam somente efluente de piscicultura (T5) apresentaram na região da nervura central redução de 25% no número de feixes de xilema quando comparadas com as plantas do tratamento controle (Tabela 5). Para compensar essa redução, foi verificado o aumento em cerca 171% no número de vasos do xilema (Tabela 5) nas folhas de plantas que receberam rega com diferentes combinações da água de piscicultura. Além disso, o uso do efluente esteve relacionado com o aparente aumento na lignificação de células do xilema, as quais foram identificadas pelo espessamento da parede e intensificação da coloração por safranina (Figuras 1B, E, H, K).

Tabela 5. Efeito do efluente de piscicultura no número médio de feixes do xilema (NFX), vasos do xilema (NVX), vasos acessórios (NVA) e espessura do mesofilo (EM) em folhas de *Lippia grata* (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamentos	NFX (mm^2)	NVX (mm^2)	NVA (mm^2)	EM (μm)
T1	20.0 \pm 1,2 a	2.8 \pm 0,1 d	3.0 \pm 0,3 a	194.222.7 \pm 9,8 a
T2	16.3 \pm 1,8 ab	3.7 \pm 0,3 c	3.0 \pm 0,3 a	194.222.7 \pm 12,5 a
T3	15.3 \pm 0,9 ab	5.6 \pm 0,1b	3.3 \pm 0,0a	203.333.0 \pm 12,5 a
T4	15.3 \pm 3,0ab	7.5 \pm 1,4a	3.3 \pm 0,3 a	205.357.7 \pm 9,1 a
T5	15.0 \pm 3,1 b	76 \pm 1,1 a	4.3 \pm 0,3a	209.143.0 \pm 11,3 a
CV%	11.24	6.25	18.6	9.58

4.4 Rendimento e composição química do óleo essencial

Quanto ao rendimento médio de óleo essencial de *L. grata* foram de 2,106% v/p (volume de óleo em mL por massa de planta), indicando não haver variações no desenvolvimento fisiológico das plantas que podem afetar a produção de óleos. Os resultados médios obtidos quanto ao rendimento e teor do óleo essencial de *L. grata* são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Rendimento de óleo essencial de *Lippia grata* irrigada com efluente de piscicultura do cultivo de Tilápia do Nilo.

VARIÁVEIS	Material vegetal (g)	Volume do óleo (mL)	Teor de óleo (%)
T1	390,9	9,6	2,45
T2	562,2	10	1,77
T3	338,1	6,5	1,92
T4	642,8	14,4	2,24
T5	474,3	10,2	2,15

A análise da composição química por GC/DIC dos óleos essenciais extraídos de plantas de *L. grata*, irrigadas com efluente de piscicultura indicou que a maioria dos compostos químicos, são constituídos de monoterpenos, sesquiterpenos não oxigenados e sesquiterpenos monocíclicos. O carvacrol (45,35 a 50,17%) como composto majoritário, além de ρ -cimeno (14,16 a 16,81%), precursor do carvacrol; timol (7,17 a 8,15%); Éter metil timol (0,27 a 2,30%), carvacrol metil timol (0,27 a 2,08%); alpha terpineno (1,94 a 2,38%) e o beta-cariofileno (2,53 a 3,38%) (Tabela 7). É importante destacar que ao se analisar tais resultados, observou-se que não ocorreram variações consistentes nas composições das amostras obtidas para diferentes tratamentos.

Tabela 7. Constituintes presentes (%) no óleo essencial extraído de folhas de *L. gracillis* irrigadas com águas de rejeito de piscicultura com diferentes concentrações de salinidade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}).

Composto	IK _{calc} ¹	IK _{lit} ²	Área relativa (%)				
			<i>L. gracilis</i> T1	<i>L. gracilis</i> T2	<i>L. gracilis</i> T3	<i>L. gracilis</i> T4	<i>L. gracilis</i> T5
alpha-Thujene	933	930	1.09	1.23	1.34	1.56	1.48
alpha-Pinene	942	932	0.24	0.26	0.29	0.34	0.32
beta-Pinene	985	979	-	0.07	0.07	0.08	0.08
beta-Myrcene	993	990	1.25	1.33	1.40	1.54	1.60
alpha-Phellandrene	1011	1002	0.19	0.17	0.18	0.20	0.19
3-Carene	1017	1011	-	0.11	0.12	0.12	0.13
alpha-Terpinene	1023	1017	1.94	2.12	2.13	2.38	2.31
p-Cymene	1031	1024	14.16	14.45	15.07	16.29	16.81
Limonene	1036	1029	0.34	0.35	0.37	0.40	0.40
cis-beta-Ocimene	1041	1037	0.24	0.24	0.23	0.24	0.24
trans-beta-Ocimene	1052	1050	0.12	0.14	0.14	0.15	0.15
gamma-Terpinene	1065	1059	12.44	13.77	13.57	15.03	14.47
Ipsdienol	1151	1145	0.94	1.02	0.97	0.98	0.90
Terpinen-4-ol	1184	1177	0.45	0.47	0.45	0.52	0.52
Thymol methyl ether	1240	1235	2.30	0.36	0.27	0.34	0.35
Carvacrol methyl ether	1244	1241	2.08	0.28	0.27	0.28	0.33
Thymol	1295	1290	7.78	8.15	7.93	7.52	7.17
Carvacrol	1306	1299	48.57	50.17	48.98	45.35	46.83

alpha-Copaene	1384	1376	-	-	0.15	0.21	0.18
beta-Caryophyllene	1429	1419	2.63	2.53	2.73	3.38	2.76
alpha-Caryophyllene	1464	1454	-	-	-	0.17	0.15
Bicyclogernacrene	1505	1500	0.37	0.11	0.35	0.40	0.31
delta-Cadinene	1532	1523	-	-	0.13	0.17	0.14
Spathulenol	1588	1578	0.18	0.19	0.17	0.16	0.15
Caryophyllene oxide	1593	1583	0.56	0.51	0.56	0.50	0.54
Total compostos (%)			97.86	98.03	97.87	98.33	98.50

¹Índice de Kovats calculado.

²Índice de Kovats da literatura (Adams, 2007).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *L. grata* irrigadas ou não com efluente de piscicultura foi testada frente a 6 cepas bacterianas apresentadas na tabela 8. Para as 2 cepas (*S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 12228) os valores de CIM foram iguais aos valores de CBM em todos os tratamentos, 0,625 e 1,25% respectivamente (Tabela 8). Para as demais cepas a concentração do óleo para a eficiência da ação bacteriostática e bactericida variou entre 0,31 a 2,5%, revelando que as cepas testadas possuem diferentes susceptibilidades em relação a ação antimicrobiana do óleo. Além destes, o óleo de *L. grata* irrigadas ou não com efluente de piscicultura também apresentou forte atividade antimicrobiana frente ao *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 8. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de óleos essenciais extraídos de folhas de *L. grata* irrigadas com águas de rejeito de piscicultura com diferentes concentrações de salinidade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (T1=452 μS ; 2,68 dS m^{-1} ; T2=4,60 dS m^{-1} ; T3= 5,55 dS m^{-1} ; T4 e T5=7,02 dS m^{-1}).

Bactérias	Óleo essencial de <i>L. grata</i> % (v/v)										
	T 1*		T2		T3		T4		T5		
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,625	1,25	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	1,25
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	1,25	1,25	0,625	0,625	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	0,625	1,25	0,625	1,25	0,625	1,25	1,25	2,5	1,25	2,5	
<i>E. coli</i> ATCC 11303	0,31	0,625	0,15	0,15	0,31	0,625	0,625	0,625	0,31	0,625	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	2,5	-	2,5	-	2,5	-	2,5	-	2,5	-	

5 DISCUSSÃO

A exposição das plantas à salinidade induz respostas morfofisiológicas e bioquímicas que se sucedem por meio de mecanismos moleculares (GUPTA; HUANG, 2014), que podem alterar a fisiologia das plantas, reduzir a fotossíntese, diminuir o crescimento e os valores de área foliar (ANJUM et al, 2011). No entanto, a tolerância e a sensibilidade das plantas variam entre as espécies. Um dos parâmetros avaliados como indicador do estresse é o crescimento (LEI *et al*, 2014). As proporções do efluente na solução de irrigação não influenciou o crescimento das plantas de *Lippia grata* quanto a sua alocação de biomassa (Tabela 3). Os resultados deste estudo, contrapõem-se aos encontrados por Oliveira (2016), que trabalhou com um efluente composto por cloreto de

sódio, cloreto de cálcio diidratado e cloreto de magnésio hexa-hidratado, em condições de casa de vegetação. Em concentrações salinas maiores ($9,9 \text{ mS cm}^{-1}$), os autores obtiveram um comportamento de menor produção de biomassa da *L. grata* nas folhas e caules. Esta resposta diferente às situações de estresse avaliadas por Oliveira (2016), pode estar ligado ao efluente utilizado, visto que o efluente oriundo do cultivo de Tilápia possui uma quantidade de nutrientes significativa provenientes das rações usadas na alimentação dos peixes e das excretas dos animais. A inalteração da área foliar entre os tratamentos avaliados pode ser um dos fatores que contribuiu para a manutenção do crescimento, uma vez que, em situações de estresse as plantas reduzem a área foliar, caracterizando uma estratégia para evitar altas taxas de transpiração, influenciando na fotossíntese e, conseqüentemente limitando a produção de biomassa (SILVEIRA et al, 2016; SILVA et al.,2011).

O crescimento é influenciado pela salinidade, também, em função do desequilíbrio osmótico, perturbação no aparelho fotossintético e na osmorregulação (NEGRÃO et al, 2017). Dessa forma, a capacidade de retenção de água nos tecidos foliares, avaliada neste estudo pelo teor relativo de água (TRA) (Tabela 3), favoreceu a tolerância à salinidade pois manteve as células túrgidas, proporcionando pleno funcionamento dos processos fisiológicos, o que influencia positivamente no processo de crescimento como demonstrado nos parâmetros de biomassa seca das folhas e caules (Tabela 3). A manutenção dos níveis de TRA em *Lippia grata* submetida a salinidade já havia sido identificada por Ragagnin et al (2013) em condições de casa de vegetação com diferentes níveis de salinidade.

A manutenção da hidratação do tecido foliar é um comportamento das plantas que conseguem se ajustar osmoticamente. Desta maneira, algumas espécies investem na síntese de açúcares ou na quebra de amido na tentativa de atenuar os danos causados pelo

estresse (ALMODARES et al, 2008; (SANTELIA; LAWSON, 2016). Neste estudo, os valores de amido diminuem (Figura 7B) nos altos níveis de salinidade, indicando que a espécie estava utilizando suas reservas polissacarídicas para produzir açúcares para osmorregulação na tentativa de manter seu metabolismo em funcionamento, conservar o potencial osmótico no tecido foliar e manter níveis de TRA similares nos tratamentos salinos.

Em situações de estresse abiótico, os vegetais acumulam no citosol ou vacúolo solutos de baixo peso molecular (prolina, glicina betaína, sacarose) para manter o equilíbrio hídrico, preservar a integridade das membranas, proteínas e enzimas (ASHRAF et al., 2011; MARIJUAN; BOSCH, 2013). No entanto, dependendo da intensidade e duração do estresse, a produção desses osmorreguladores pode ou não ser intensificada. Neste trabalho, observou-se que os níveis de prolina diminuíram nos níveis maiores de concentração do efluente (Figura 7C). Este achado indica, mais uma vez, que a produção de açúcares serviu como o principal mecanismo de regulação para a manutenção do potencial hídrico e turgência do tecido foliar. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Hu et al. (2012) em plantas do trigo, onde os níveis de prolina caíram quando os níveis de açúcares foram elevados, uma vez que além de atuarem na osmorregulação, altos valores de açúcares auxiliaram o vegetal na eliminação das EROS (Cuoee et al., 2006).

O nível de danos à membrana mensurado por meio do extravasamento de eletrólitos em função da condutividade elétrica (MUNS e TESTER, 2008) e o níveis de malondilaldeído (MDA) são importantes indicadores do estresse oxidativo. Os resultados obtidos nesse trabalho não configuram estresse salino, indica que a salinidade do efluente não ocasionou o aumento da peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana de *L. grata* confirmando o grau de tolerância da espécie em estudo.

- Os padrões de peroxidação lipídica podem ser modulados de acordo com a quantidade de ROS gerada e da capacidade de defesa das células. Um dos fatores que pode aumentar a peroxidação de lipídios é a produção excessiva e não remoção do H_2O_2 . Esse composto é naturalmente sintetizado pelas plantas e sua produção ocorre principalmente por meio da fotorrespiração ou como resultado da dismutação dos íons superóxido, pela superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 pode reagir com íons Fe^{2+} e formar o radical hidroxila ($\cdot OH$), uma ROS que pode peroxidar lipídios de membrana (Sewelam et al, 2016). Entretanto nem sempre o aumento nos teores de H_2O_2 em plantas acarretará um aumento da peroxidação de lipídios e estresse oxidativo, o qual pode levar à inativação de enzimas, limitação de crescimento e desenvolvimento das plantas (GIL; TURJETA, 2010; CHOUDHURY et al, 2013). Dessa maneira, afim de superar os efeitos negativos causados pelas ROS, as plantas apresentam um mecanismo de defesa antioxidante enzimático, composto principalmente por superóxido dismutase (SOD), ascorbato peróxidase (APX) e catalase (CAT) (SEWELAM ET AL., 2016). O H_2O_2 gerado pela SOD aciona as enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), que são responsáveis pela redução do peróxido em H_2O e O_2 . Essas enzimas atuam de acordo com seus graus de especificidade, onde a enzima CAT atua de maneira mais expressiva em condições de maior severidade (por exemplo, o T4), uma vez que necessita de duas moléculas de H_2O_2 para a reação. Por outro lado, a enzima APX é mais sensível e tem a capacidade de reagir com apenas uma molécula de H_2O_2 , tendo menor destaque portanto, nas mesmas condições (por exemplo, o T2). Isso significa dizer, que no nível 4 de salinidade, a CAT foi a enzima mais acionada para remover o peróxido em relação à APX (Figura 9). O aumento na atividade da CAT foi observada por Gondim et al (2012) em um trabalho com plantas de milho submetidas ao estresse por NaCl, onde os efeitos danosos da salinidade não prejudicaram as variáveis de crescimento. Este resultado é

indicado pelos autores em função da atuação do sistema antioxidante, especialmente da CAT.

Em situações de estresse, o conteúdo dos pigmentos pode ser afetado com a diminuição da biossíntese ou a aceleração da degradação dos mesmos (TAIZ; ZEIGER, 2013; ASHRAF; HARRIS, 2013). Dessa maneira, na tentativa de buscar modular-se às condições de salinidade e temperatura, as quais estavam expostas, a espécie investiu na produção de pigmentos fotossintéticos, como os carotenoides, que além de atuarem no aparelho fotossintético, atuam como componentes não enzimáticos do sistema antioxidante na fotoproteção e dissipação de energia, evitando assim a formação e auxiliando no combate das espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, diminuindo os efeitos danosos sobre o aparato fotossintético da planta. O efeito fotoprotetor dos carotenoides auxilia na dissipação de energia por exposição a altas temperatura e luminosidade (DOMONKOS et al, 2013), através de proteínas presentes no lúmen do tilacóides (LI et al, 2000).

Quanto a anatomia, os resultados indicam que o efluente de piscicultura favoreceu o desenvolvimento do sistema vascular através do aumento do número de vasos do xilema, sendo considerado como uma adaptação anatômica à salinidade, objetivando melhorar o fluxo de água, visto que a frequência dos vasos do xilema e traqueídes são determinantes da condutância da água (SÁNCHEZ-AGUAYO, ET AL., 2004). Além de ser responsável pelo transporte de água e solutos a longas distâncias, o xilema está relacionado com o suporte mecânico (COSTA ET AL., 2004), evitando que as células se colapsem, prevenindo os efeitos danosos da cavitação (ELLER ET AL., 2018).

A presença de cristais de oxalato de cálcio não é uma característica comum a todos os membros da família Verbenaceae (SOUZA ET AL., 2005; BRAGA ET AL., 2009),

entretanto, já foi documentada a presença desses cristais em folhas de outras espécies do gênero *Lippia*, sendo destacado como uma característica xeromórfica (ANDERSEN et al., 2006). Por outro lado, a manutenção do número de vasos auxiliares (NVA) nas folhas das plantas submetidas a diferentes concentrações de água de piscicultura denotam que nas plantas submetidas ao tratamento com 100% da água de piscicultura não houve a necessidade de investir na formação de novos feixes vasculares para otimizar o transporte de recursos.

Uma vez que o efluente de piscicultura não interferiu no balanço hídrico das células de modo a prejudicar o transporte de água, mantendo a espessura do mesofilo semelhante, mesmo quando foi utilizada a água de piscicultura a 100% (Tabela 5; Figura 10), indicando que houve manutenção hídrica nas células, uma vez que a disponibilidade de água é um dos fatores que afeta em primeira instância a manutenção da turgescência celular (SANTOS; CARLESSO, 1998), podendo conseqüentemente refletir na espessura do mesofilo.

Os óleos essenciais são componentes do metabolismo secundário das plantas que são extraídos de diversas partes dos vegetais (OUSSALAH et al, 2007). Esses compostos garantem as plantas algumas vantagens, como o combate a agentes microbianos (GUTIERREZ et al, 2008). No entanto, a composição química e o teor do óleo essencial de uma mesma espécie são associados a uma variedade de fatores. Segundo Moraes (2009), caracteres genéticos, idade e alguns fatores climáticos e ambientais, podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários pelas plantas. Dependendo do ambiente onde a planta se encontra ou dos níveis de sal aos quais é exposta (NEFFATI; MARZOUK, 2008), os estímulos podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos, alterando o teor e a composição química dos óleos essenciais. As condições do ambiente de cultivo não

alteraram a composição química e o teor de rendimento do óleo nas condições avaliadas por esse estudo. Resultados semelhantes para os níveis de Tymol e Carvacrol foram encontrados por Albuquerque et al (2012) e Ragagnin (2013) em plantas da mesma espécie, o que indica um elevado potencial antimicrobiano (PEREIRA et al, 2008).

Os óleos essenciais são compostos que, por serem hidrofóbicos, são facilmente difundidos pela parede celular dos microrganismos e causam danos à membrana, principalmente no que diz respeito à fluidez e permeabilidade (MILLEZI et al., 2012). Dessa maneira, a forte atividade antimicrobiana frente ao *Pseudomonas aeruginosa* comprovam o potencial de utilização deste óleo como agente antimicrobiano natural para aplicações futuras em alimentos. Portanto, os óleos essenciais, inclusive o de capim limão, têm maior atividade frente a bactérias gram positivas. As gram-negativas são mais resistentes devido à maior complexidade da sua membrana plasmática, que atua como uma barreira à difusão dos componentes hidrofóbicos dos óleos essenciais (NAIK et al., 2010).

É sabido que o efluente de piscicultura apresenta elevados teores de excrementos e nutrientes que podem modificar as características da solução de irrigação ao nível de inviabilizar seu uso em outras atividades, como na agricultura (MERCANTE *et al.*, 2004; MAINARDES PINTO; MERCANTE, 2003). Os resultados da presente pesquisa são pertinentes quanto ao planejamento e manejo para uso do efluente de piscicultura dos tanques experimentais de cultivo da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, que atualmente é descartada sem nenhum aproveitamento. Neste sentido, o conjunto de resultados obtidos respaldam as respostas observadas nos parâmetros de crescimento, anatômicos e bioquímicos, consolidando a indicação da água de piscicultura utilizada neste experimento para o reaproveitamento na irrigação de plantios de *Lippia grata*, espécie endêmica da Caatinga e com potencial farmacológico.

6 CONCLUSÕES

A manutenção do nível de produção de biomassa, da área foliar e do teor relativo de água associados a produção de açúcares, pigmentos e atividade das enzimas do sistema antioxidante indicam que a irrigação de *Lippia grata* com efluente salino de piscicultura não afetou o desenvolvimento dessa espécie. Dessa forma, a reutilização deste efluente torna-se possível no cultivo de uma espécie nativa com potencial antimicrobiano, evitando-se o descarte deste efluente no ambiente e conseqüentemente contribuindo para a preservação do meio ambiente e manutenção do patrimônio hídrico. Além disso, apresenta importância sócio-econômica por oferecer aos produtores de tilápia outra possibilidade ou a ampliação de renda.

Referencias

_____. The state of world fisheries and aquaculture 2014. Rome: FAO. 2014. 221p. Disponível em: <<http://www.fao.org/documents/card/en/c/097d8007-49a4-4d65-88cdfcaf6a969776/>> Acesso em 16 de agosto de 2018.

_____. **Fisheries and Aquaculture Department. Fisheries and Aquaculture and Climate Change.** Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department. 2012a, 237p.

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945216300061?via%3Dihub>> Plant Sci. v. 245, p. 94-118, 2016. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.01.006.

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th Edition **Allured Publishing Corporation**, Carol Stream, 2007.

Agência Nacional de Águas – ANA. Ministério do Meio Ambiente. **Atlas da irrigação: uso da água na agricultura irrigada.** Brasília: ANA, 2017, 86 p.

Agência Nacional de Águas – ANA. Ministério do Meio Ambiente. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: Informe 2014.** Brasília: ANA, 2015, 107p.

ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MARIANO, R. L. R.; WILLADINO, L.; MARCELINO JÚNIOR, C.; ULISSES, C. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v. 49, n. 4, p. 527-535, 2006.

ALBUQUERQUE, C.C. et al. Effects of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer on caulinary shoots of heliconia cultivated in vitro. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.1, p.26-33, 2012.

ALBUQUERQUE, C.C. et al. Effects of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer on caulinary shoots of heliconia cultivated in vitro. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.1, p.26-33, 2012.

ALMODARES, A., HADI, M., DOSTI, B. The effects of salt stress on growth parameters and carbohydrates contents in sweet sorghum. **Research journal of environmental sciences**. v. 2, p. 298-304, 2008.

ANDERSEN, A.; F LUCCHINI, F.; J MORICONI, FERNÁNDEZ, EA. Variabilidad en la morfo-anatomía foliar de *Lippia turbinata* (verbenaceae) en la provincia de San Luis (Argentina). **International Journal of Experimental Botany**. v. 75. 137-143, 2006.

ANJUM, S., XIE, X., WANG¹, L. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**. v. 6, p. 2026-2032, 2011.

ASADA, K. **Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions**. *Plant Physiology*, v.141, p.391-396, 2006. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/141/2/391.full.pdf+html>>. Acesso em: 19 setembro de 2018. doi: 10.1104/pp.106.082040.

ASHRAF, M.; AKRAM, N.A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M.R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v.111, p.249-296, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-387689-8.00002-3.

ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Photosynthesis under stressful environments. **Photosynthetica**, v. 51, p. 163-190, 2013.

AZEVEDO RA, et al. Alas RM, Smith RJ, Lea PJ. Response of antioxidant enzymes to transfer from 597 elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and

roots of wild-type and 598 a catalase-deficient mutant of barley [Internet]. **Physiologia Plantarum**. 1998. pp. 280–292. 599 doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.x

BARBOSA, D.C.A.; BARBOSA, M.C.A.; LIMA, L.C.M. Fenologia de Espécies Lenhosas da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Org). **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Ed. Universitária da UFPE. p. 657-694, 2003.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100021>. Acesso em: 26 out. 2018. doi: 10.1590/S0100-40422006000100021.

BERNARDI, C.C. Reúso de água para irrigação. Brasília, DF: ISEA-FGV/ECOBUSINESS School, 2003, 52p.

BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. **Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives**. *Biotechnology Advances*, v.29, p.850-859, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000991>>. Acesso em: 25 out. 2018. doi 10.1016/j.bbr.2011.03.031

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. **Enfield: Science Publishers**, p.1-30, 2010.

BRAGA, J. M. F.; PIMENTEL, J. M. M. FERREIRA, C. P.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S. Morfoanatomia, histoquímica e perfil fitoquímico de *Priva lappulacea* (L.) Pers. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 19(2B): 516-523, Abr./Jun. 2009.

BRASIL. Lei n. 9.433, de 8 de janeiro de 1997. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/Ccivil_03/Leis/L9433.htm . Acesso em: 10 out. 2018.

BREGA FILHO, D.; MANCUSO, P.C.S. Conceito de reúso de água. In: MANCUSO, P.C.S.; SANTOS, H.F. (ed). Reúso de água. Barueri: Manole, 2003. p. 21-36.

CERRATINGA. Caatinga. Disponível em: <http://www.cerratinga.org.br/caatinga/>. Disponível em: 25 de abril de 2017.

CHOUDHURY, S. PANDA, P. SAHOO, L., PANDA, S.K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signaling e Behavior**, v. 8, p. 1-6, 2013.

CORCORAN, E. et al. Sick Water?: The Central Role of Wastewater Management in Sustainable Development. Arendal, Norway: Birkeland Trykkeri As, 2010. 88 p. (Rapid Response Assessment). **United Nations Environment Programme**, UN-HABITAT.

CORCORAN, E. et al. Sick Water?: The Central Role of Wastewater Management in Sustainable Development. Arendal, Norway: **Birkeland Trykkeri** As, 2010. 88 p.

COSTA, C. G.; CALLADO, C. H.; CORADIN, V.T.R.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Xilema. In: APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Editora UFV. 2004. p. 130-154. (438 páginas).

CUNHA, A. H. N.; OLIVEIRA, T. H. de; FERREIRA, R. B.; MILHARDES, A. L. M.; SILVA, S. M. da C. e. **O reúso de água no Brasil: a importância da reutilização de água no país**. Enciclopédia livre, Centro Científico, Goiânia, 2011, v. 7, n. 13, p. 1225 – 1248.

CUOEE, I., SULMON, C., GOUESBET, G., AMRANI, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**. v.57, p. 449-459, 2006.

DINAKAR, C. et al. **Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense.** *Plant Science*, v.182, p.29-41, 2012.

Disponível em: <<http://ac.els-cdn.com/S0168945211000379/1-s2.0-S0168945211000379>>. Acesso em: 16 de outubro de 2018. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.01.018.

DOLATABADIAN, A.; MODARRESSANAVY, S. A. M.; GHANATI, F. Effect of salinity on growth, xylem structure and anatomical characteristics of soybean. **Not Sci Biol.** v. 3, pp. 41–45, 2011.

DOMONKOS, I., KIS, K., GOMBOS, Z., UGHY, B. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. **Prog. Lipid Res.** v. 52, p. 539–561, 2013.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfield: Science Publishers**, v.9, p.178-203, 2011.

ELLER, C. B., BARROS, F. V.; BITTENCOURT, P. R. L.; ROWLAND, L.; MENCUCCINI, M.; OLIVEIRA, R. S. Xylem hydraulic safety and construction costs determine tropical tree growth. **Plant Cell Environ.** 2018;1–15. DOI: 10.1111/pce.13106.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Aquicultura: manejo e aproveitamento de efluentes.** São Paulo: EMBRAPA, 2013. 39 p.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Aquicultura: manejo e aproveitamento de efluentes.** São Paulo: EMBRAPA, 2013. 39 p.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges.** Rome: FAO, 2016. 243 p.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Rome: FAO, 2016. 243 p.

FELIZATTO, M.R. ETE CAGIF: **Projeto integrado de tratamento avançado e reúso direto de águas residuárias**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21, 2001, João Pessoa: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Anais... João Pessoa, 2001. CD-ROM.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: A Computer Statistical Analysis System. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011. Disponível em: Acesso em: 29 jan. 2019.

FOYER C.H., RUBAN AV, NOCTOR G. Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage. **Biochem J**; v. 474, p. 877-83, 2017.

GARDINER, B. BERRY, P. MOULIA, B. Review: Wind Impacts on Plant Growth, Mechanics and Damage. *Plant science*; v. 245, p. 94-118, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.01.006>

GARG, A.K. *et al.* Thehalose accumulaton in rice plants confers high tolerance levels to dirrerent abiotic stresses. **Proc. Natl. Acad, Sci.** v. 99, p. 15898-15903, 2002.

GIL, S.S.; TUTEJA, N. **Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants**. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.48, p.909-930, 2010. Disponível: <http://www.plantstress.com/articles/up_oxidative_fi

les/Antioxidants%20and%20stress%20tolerance%202010.pdf>. Acesso em: 25 de Agosto de 2018. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

GILL, S.S., TUJETA, N. Reactive oxygen species and antioxidante machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GOLLDACK, D.; LI, C.; MOHAN, H.; PROBST, N. Tolerante to drought and salt stress in plants: unwareling the signaling networks. **Frontier Plant Science**, v. 5, p. 151. 2014.

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

GUPTA B., HUANG B. Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. **International Journal of Genomics**, 2014.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

HASEGAWA, P.M. Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 92, p. 19-31, 2013.

HENRY-SILVA, G. G; CAMARGO, A. F. M. **Impacto das atividades de aquíicultura e sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas – relato de caso.** Boletim do Instituto de Pesca, v. 34, n.1, p. 163-173, 2008.

HOLANDA, A. C. et al.; **Desenvolvimento inicial de espécies arbóreas em ambientes degradados por sais**. Revista de Biologia e Ciências da Terra. v. 7, nº 1, 2007.

HU, M., SHI, Z., ZHANG, Z., ZHANG, Y., LI, H. Effects of exogenous glucose on seed germination and antioxidant capacity in wheat seedlings under salt stress. **Plant growth regul.** v. 68, p. 177-188, 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estatistica/>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estatistica/>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. Rio de Janeiro: IPEA, 2017.

IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. Rio de Janeiro: IPEA, 2017.

IQBAL, N.; *et al.* Nitrogen availability regulates proline and ethylene production and alleviates salinity stress in mustard (*Brassica juncea*). **Journal of Plant Physiology**, 2015, 178, 84- 91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.02.006>.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**,

v.5, n.6, p.709-725, 2011. Disponível em: <http://www.cropj.com/kim_5_6_2011_709_725.pdf>. Acesso em: 29 de setembro 2018.

KAZAN, K Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. **Trends Plant Sci.** v. 20, p. 219–229, 2015.

KOVALCHUK, I. Multiple roles of radicals in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfield: Science Publishers**, p.31-44, 2010.

KUMMER, A. C. B.; SILVA, I. P. F.; LOBO, T. F.; GRASSI FILHO, H. **Qualidade da água residuária para irrigação do trigo.** In: ANAIS IV WORKSHOP INTERNACIONAL DE INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS NA IRRIGAÇÃO E I INOVAGRI INTERNATIONAL MEETING, Fortaleza, 2012.

LEI, B. Scanning ion-selective electrode technique and X-ray microanalysis provide direct evidence of contrasting Na⁺ transport ability from root to shoot in salt-sensitive cucumber and salt-tolerant pumpkin under NaCl stress. **Physiologia Plantarum**, v. 152, p. 738-748, 2014.

LI, X.P., BJORKMAN, O., SHIH, C., GROSSMAN, A.R., ROSENQUIST, M., JANSSON, S., NIYOGI, K. K., A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*. v. 403, p. 391–395, 2000.

LIBUTTI, A. et al. Agro-industrial wastewater reuse for irrigation of a vegetable crop succession under Mediterranean conditions. **Agricultural Water Management**, [s.l.], v. 196, p.1-14, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2017.10.015>.

LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate-glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfield: Science Publishers**, p.45-64, 2010.

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

M. TESTER, R. DAVENPORT, Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Ann. Bot.** v. 91, p. 503–527, 2003.

MACHADO, N.G. et al. Seasonality of Energy Balance and Evapotranspiration in a Flooded Scrubland in the Pantanal of Mato Grosso. - **Rev Bras Meteorol.** v 31, p 82-91, 2016.

MAINARDES-PINTO, C. S. R.; MERCANTE, C. T. J. Avaliação de variáveis limnológicas e suas relações com uma floração de Euglenaceae pigmentada em viveiro povoado com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus), São Paulo, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences.** Maringá, v. 25, no. 2, p. 323-328, 2003.

MARIJUAN, M.P.; BOSCH, S.M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v.18, p.660-666, 2013. DOI: 10.1016/j.tplants.2013.08.006.

MARRETO, R. N.; ALMEIDA, E.E.C.V.; ALVES, P.B.; NICULAU, E.S.; NUNES, R.S.; MATOS, C.R.S.; ARAÚJO, A.A.S. Thermal analyses and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropylmethyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta.** v. 475. p.53-58. 2008.

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

MERCANTE, C.T.J. 1; CABIANCA, M.A. 1 ; SILVA, D.1 ; COSTA, S.V. 1 & ESTEVES, K.E. Water quality in fee-fishing ponds located in the metropolitan region of São Paulo city, Brazil: an analysis of the eutrophication process. *Acta Limnol. Bras.*, 16(1):95-102, 2004

MIERZWA, J.C.; HESPANHOL, I. **Água na Indústria – Uso racional e reúso**. Editora Oficina de Textos. São Paulo, 144 p. 2005.

MILLEZI, A. F., *et al.* 2012a. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *thymus vulgaris*, *cymbopogon citratus* and *laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, pp. 0-0. Epub Feb 24, ISSN 0101-2061. http://dx.doi.org/10.1590/S0101_20612012005000021.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Caatinga.

<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>. Em 25 de abril de 2017. Brasília. 2017.

MITTLER, R. **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance**. *Trends in Plant in Science*, v.9, p.405-410, 2002. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1360138502023129/1s2.0-S1360138502023129-main.pdf?_tid=18fce1ee-f799-11e19e23-00000aacb35f&acdnat=1346877451_8e3e01c159c2ce299d9a230bd1cd09e8>. Acesso em: 25 ago. 2018. doi: 10.1016/ S1360-1385(02)02312-9.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

- MORAIS, L. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050-4063, 2009.
- NAIK, M.I.; FOMDA, B.A.; JAYKUMAR, E.; BHAT, J.A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 1, n.1, p. 535-538, 2010.
- NEFFATI, M. & MARZOUK, B. Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. **Industrial Crops and Products**. 28: 137-142, 2008.
- NEGRÃO, S. et al. **Evaluating physiological responses of plants to salinity stress**. *Ann. Bot.* 119, 1–11, 2017.
- OH, D.H. Loss of halophytism by interference with SOS1 expression. **Plant Physiol.** v. 151, p. 210–222, 2009.
- OH, S.W. et al. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. **Nature Genetics** v. 38, 2006. p. 251-257.
- O'LEARY,; et al. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2012, 170, 197–219.
- OLIVEIRA, A. C. L. et al. Produção de mudas de dois genótipos de alecrim-de tabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer) em função de fertilizante mineral, calcário, substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 35-42, 2011.
- OLIVEIRA, E. G.; SANTOS, F. J. S. Conservação e uso racional de água: Integração aquicultura-agricultura. In: MEDEIROS, S. S.; GHEYI, H. R.; GALVÃO, C. O.; PAZ,

V. P. S. (Eds). **Recursos hídricos em regiões áridas e semiáridas**. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, p.113- 161, 2011.

OLIVEIRA, F. F.M. **Comportamento de plantas de *Lippia gracilis* Schauer em condições de diferentes níveis de salinidade da água de irrigação**. Mossoró, UERN. 2016. 92p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2016.

OLIVEIRA, F.F.M. **Comportamento de Plantas de *Lippia gracilis* Schauer em condições de diferentes níveis de Salinidade da água de irrigação**. Mossoró: UERN,2016. 92 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, 2016.

ONU Brasil. **Até 2030 planeta pode enfrentar déficit de água de até 40%, alerta relatório da ONU**. 2015. Disponível em: <goo.gl/R2Dhmp>. Acesso em: 3 nov. 2018.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PEREIRA, A. C. R. L.; OLIVEIRA, J.V.; GONDIM JUNIOR, M. G. C.; CAMARA, C. A. G. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. **Ciênc. Agrotec.** v. 32, p. 717-724, 2008.

PEREIRA, A. C. R. L.; OLIVEIRA, J.V.; GONDIM JUNIOR, M. G. C.; CAMARA, C. A. G. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. **Ciênc. Agrotec.** v. 32, p. 717-724, 2008.

R. MUNNS, R.A. JAMES, A. LAUCHLI. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals, **J. Exp. Bot.** v. 57, p. 1025–1043, 2006.

R. MUNNS, R.A. JAMES, Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. **Plant Soil**, v. 253, p. 201–218, 2003.

R. MUNNS, R.A. JAMES, Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat, **Plant Soil**, 2002.

RAGAGNIN, R. C. G. **Efeito do Estresse Salino no Crescimento e na qualidade do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer**. Mossoró: UERN, 2013. 46 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, 2013.

SÁNCHEZ-AGUAYO, I.; RODRÍGUEZ-GALÁN, J. M.; GARCÍA, R.; TORREBLANCA, J.; PARDO, J. M. Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. **Planta**. v. 220, p 278–285, 2004. DOI 10.1007/s00425-004-1350-2.

SANTELIA, D., LAWSON, T., Rethinking Guard Cell Metabolism. **Plant physiol.** 172, 371–724 1392. Doi:10.1104/pp.16.00767. 2016.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. 1998. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, n.3, p. 287-294.

SARIG, S. The immigration for fish culture into general farm irrigation systems in Israel. **Bamidgeh**. v.36, p. 16-20, 1994.

SCHENEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**. v. 9, 671-675.

Sewelam, N.; Kazan, N.; Schenk, P. M. 2016. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. **Front. Plant Sci.**, v. 7, n. 187, p. 1 - 21

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-26, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/21703>>. Acesso em: 04 out. 2018. doi: 10.1155/2012/217037.

SHARP, R.E. *et al* Growth of the maize primary root at low water potentials II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment, **Plant Physiol**. v. 93, p. 1337-1346, 1990.

SILVA, M. B. R.; FERNANDES, P. D.; NETO, J. D.; NERY, A. R.; RODRIGUES, L. N.; VIÉGAS, R. A. Crescimento e produção do pinhão-mansão irrigado com água residuária sob condições de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 621-629, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662011000600013>.

SILVEIRA, J.A.G. et al. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Plant Physiol**. v. 160, p. 1212-1229, 2002.

SILVEIRA, J.A.G. et. al. Salt resistance in two cashew species is associated with accumulation of organic and inorganic solutes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, n.5, p.1629-1637, 2012.

SILVEIRA, P. S. A ação dos brassinosteróides no crescimento de mudas de pinhão manso sob déficit hídrico. **Agri-Environmental Science**. v. 2, 52-61, 2016.

SOUZA, E. R. DE; FREIRE, M. B. G. DOS S.; CUNHA, K. P. V. DA; NASCIMENTO, C. W. A. DO; RUIZ, H. A.; LINS, C. M. T. Biomass, anatomical change and osmotic potential in *Atriplex nummularia* L. cultivated in sodic saline soil under water stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.82, p.2027, 2012.

SOUZA, T. J. T.; MANFRON, M. P.; ZANETTI, G. D.; HOELZEL, S. C. S. M.; PAGLIARIN, V. P. Análise Morfo-Histológica e Fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth. **Acta Farm. Bonaerense**, 2005. ISSN 0326-2383.

SZARKA, A.; TOMASSKOVICS, BÁNHEGYI, G. The Ascorbate-glutathione- α -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response. **Int J Mol Sci**. v. 13, n. 4, p. 4458–4483, 2012.

TAIS, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TETENS, V.O.: Über einige meteorologische Begriffe, Zeitschrift Geophysic. - Würzburg. 6:297-309, 1930.

TOZIN, L. R. S.; MARQUES, M. O. M.; RODRIGUES, T. M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia organoides* Kunth (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 87, n. 2, pp. 943 – 953, 2015.

VAN GENUCHTEN, M. Th. A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. **Soil Science Society of America Journal**, v.44, p.892-898, 1980.

WU, X.X; et al Ectopic expression of Arabidopsi thaliana Na⁺(K⁺)/H⁺ antiporter gene AtNHX5 enhances soybean salt tolerance. **Genet. Mol.** v. 15, 1-12, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027483>.