



ÉRICA ALVES MARQUES MARAFELI

**CULTIVO DE *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* (P. Silva
and M. Silva) Hinz SOB OMISSÃO DE NUTRIENTES EM
SISTEMA HIDROPÔNICO E MALHAS COLORIDAS:
VALIDAÇÃO ANALÍTICA, DOSEAMENTO DE
CARDENOLÍDEOS E CRESCIMENTO VEGETATIVO**

**LAVRAS - MG
2022**

ÉRICA ALVES MARQUES MARAFELI

**CULTIVO DE *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* SOB OMISSÃO DE
NUTRIENTES EM SISTEMA HIDROPÔNICO E MALHAS COLORIDAS:
CRESCIMENTO VEGETATIVO E DOSEAMENTO DE CARDENOLÍDEOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Manejo de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Doutor.

Profa.Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Coorientador

**LAVRAS - MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Marafeli, Érica Alves Marques.

Cultivo de *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* (P. Silva and M. Silva) Hinz sob omissão de nutrientes em sistema hidropônico e sob malhas coloridas: crescimento vegetativo e doseamento de cardenólídeos / Érica Alves Marques Marafeli. - 2021.

174 p. : il.

Orientadora: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Coorientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Doutorado (Tese) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Elementos faltantes. 2. Qualidade espectral de luz. 3. Glicoevatromonosídeo. I. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. II. Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. III. Título.

ÉRICA ALVES MARQUES MARAFELI

CULTIVO DE *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* SOB OMISSÃO DE NUTRIENTES EM SISTEMA HIDROPÔNICO E MALHAS COLORIDAS: CRESCIMENTO VEGETATIVO E DOSEAMENTO DE CARDENOLÍDEOS

CULTIVATION OF *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* (P. Silva and M. Silva) Hinz UNDER THE OMISSION OF NUTRIENTS IN A HYDROPONIC SYSTEM AND COLORED SCREENS: ANALYTICAL VALIDATION, CARDENOLIDE DOSAGE, AND VEGETATIVE GROWTH

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Manejo de Plantas Medicinais, para a obtenção do Título de Doutor.

APROVADA em 03 de dezembro de 2021.

Dr. Rodrigo Maia de Pádua	UFMG
Dr. Felipe Campos Figueiredo	IFSUL de Minas
Dr. Lucas Apolinário Chibli	UNICAMP

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Coorientador

**LAVRAS - MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Por todas as oportunidades, pelas coisas e fatos bons e ruins, que contribuíram para o meu progresso e desenvolvimento; entrei uma menina cheia de sonhos, saí uma mulher com mais sonhos ainda.

Pela minha existência, pelos meus familiares, meus queridos amigos e por todas as bênçãos recebidas.

Em especial, à professora Suzan Kelly, não porque é de bom tom agradecer ao orientador, mas, sim, por ser tão doce e carinhosa comigo, muitas vezes, pensei em desistir, mas via nela o exemplo de mulher forte e guerreira.

Ao professor José Eduardo por ser tão respeitoso com meu trabalho e por me ajudar em tudo até em montar experimento, por acreditar no meu trabalho e servir de exemplo em minha vida.

Aos meus amigos Júlia, Thaína, Marlon, Adriane, Francinele, Alessandra, Sâmia, Moacir pelos bons momentos e risadas e por me ajudarem a crescer como pessoa.

Ao Lucas Apolinário pela determinante contribuição, no início do meu trabalho, foi tão respeitoso e cuidadoso com uma pessoa que nem conhecia, isso me marcou muito.

Ao professor Rodrigo Maia de Pádua da UFMG pelo apoio em toda a pesquisa.

Ao Alexandre Alves pela ajuda em vários momentos durante meu trabalho.

À UFLA e a todos os seus técnicos, como Dico, Giúlia, Annete.

À CAPES pela bolsa.

Ao meu amado esposo Diego e pais, Tânia e Cláudio, pelas longas conversas e incentivos.

Ao mundo e aos seres de luz que conspiram sempre a meu favor.

RESUMO GERAL

Espécies do gênero *Digitalis*, popularmente conhecidas como "Dedaleira", são a principal fonte de heterosídeos cardiotônicos (HCs) do tipo cardenolídeos, responsáveis por grande parte de suas propriedades farmacológicas e aplicações terapêuticas. O cardenolídeo glicoevatromonosídeo (GEV), produzido em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, possui grande valor medicinal por inibir efetivamente o vírus da *Herpes simplex* tipo 1 (VHS-1), aciclovir-resistente e demonstrou atividade anticancerígena *in vitro*. Objetivou-se avaliar o crescimento vegetativo e acúmulo de cardenolídeos totais e do glicoevatromonosídeo (GEV), em plantas cultivadas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, em vasos sob diferentes malhas coloridas e em sistema hidropônico sob omissão de macro e micronutrientes. Para isto, primeiramente foi desenvolvido e validado um método de doseamento de GEV por CLAE-DAD, conforme critérios do guia ICH - *International Conference on Harmonisation* (ICH, 1996) e da Resolução RE no 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017). Foram instalados dois experimentos agronômicos: no primeiro, mudas de *D. mariana* ssp. *heywoodii* cultivadas sob malhas fotoconversoras nas colorações azul, vermelha e preta e a pleno-sol. No segundo experimento, mudas foram cultivadas em sistema hidropônico, empregando a técnica do elemento faltante, com omissão individual dos macros e micronutrientes da solução de Hoagland e Arnon (1950). A solução completa de Hoagland e Arnon (1950) foi usada como controle. Parâmetros de crescimento, morfologia, acúmulo de proteínas, pigmentos fotossintéticos, cardenolídeos e GEV foram analisados. As diferenças entre os grupos avaliados foram consideradas estatisticamente significativas de acordo com Tukey (5%). A tela de cor azul proporcionou a maior quantidade de matéria seca de folha (12,69 g), crescimento de raiz (54,00 cm), área foliar (46,97 cm²), teores de proteína (0,118 mg mL⁻¹), clorofila *a* (1,88 mg g⁻¹). Em relação aos cardenolídeos totais, as telas azul e vermelha não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de significância (2,29% e 2,33%, respectivamente). Os maiores teores de GEV foram encontrados apenas em plantas cultivadas sob tela azul (26,0 µg/100g de material vegetal). A omissão de nitrogênio (N), fósforo (P), enxofre (S) e manganês (Mn) não afetou o crescimento da parte aérea das plantas. A deficiência de boro (B) e magnésio (Mg) causou maior acúmulo de proteínas totais (0,066 e 0,062 mg mL⁻¹, respectivamente). Entretanto a deficiência de enxofre (S) causou uma queda de 51,9% em relação ao tratamento completo. A limitação de nutrientes impactou o acúmulo de cardenolídeos totais na seguinte ordem Cu = Fe = Mg = Ca > Mn = B = Zn > S = K = P = N = completo. O método cromatográfico desenvolvido e validado foi empregado com sucesso nas análises quantitativas de GEV. Diferentes espectros luminosos e disponibilidade de macro e micronutrientes influenciam no crescimento vegetativo, produção de pigmentos fotossintetizantes, proteínas e teores de cardenolídeos totais e GEV em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.

Palavras-chave: Elementos faltantes. Qualidade espectral de luz. Glicoevatromonosídeo. Dedaleira.

GENERAL ABSTRACT

Species of the *Digitalis* genus, commonly known as 'Foxglove', are the main source of cardiotonic heterosides (CHs) of the cardenolide type, responsible for much of their pharmacological properties and therapeutic applications. The cardenolide glucoevatromonoside (GEV), produced in *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* has great medicinal value for effectively inhibiting the acyclovir-resistant *Herpes simplex* type 1 (HSV-1) virus, demonstrating anticancer activity *in vitro*. This paper aimed to evaluate the vegetative growth and accumulation of total cardenolides and glucoevatromonoside (GEV) in cultivated plants of *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, in pots under different colored screens and a hydroponic system under omission of macro and micronutrients. For this purpose, a GEV dosage method by HPLC-DAD was first developed and validated, according to the criteria of the ICH guide - *International Conference on Harmonization* (ICH, 1996) and ANVISA Resolution RE n° 166 of July 24th, 2017 (BRASIL, 2017). Two agronomic experiments were installed. The first consisted of *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* seedlings cultivated under blue, red, and black photo converter screens and full sun. The second experiment consisted of seedlings cultivated in a hydroponic system, employing the missing element technique, with the individual omission of macro and micronutrients from the Hogland and Arnon (1950) solution. The complete Hogland and Arnon (1950) solution was used as the control. Growth parameters, morphology, protein accumulation, photosynthetic pigments, cardenolides, and GEV were analyzed. The differences between the groups evaluated were considered statistically significant according to the Tukey test (5%). The blue screen provided the highest amount of leaf dry matter (12.69 g), root growth (54.00 cm), leaf area (46.97 cm²), protein content (0.118 mg mL⁻¹), and chlorophyll *a* (1.88 mg g⁻¹). The blue and red screens showed no significant difference at the level of 5% significance (2.29% and 2.33%, respectively) for total cardenolides. The highest levels of GEV were found only in plants cultivated under the blue screen (26.0 µg/100g of plant material). The omission of nitrogen (N), phosphorus (P), sulfur (S), and manganese (Mn) did not affect the growth of the aerial part of the plants. Boron (B) and magnesium (Mg) deficiency caused a greater accumulation of total protein (0.066 and 0.062 mg mL⁻¹, respectively). However, sulfur (S) deficiency caused a decrease of 51.9% compared to the full treatment. The nutrient limitation impacted the accumulation of total cardenolides in the following order: Cu = Fe = Mg = Ca > Mn = B = Zn > S = K = P = N = full. The chromatographic method developed and validated was successfully used in the quantitative analysis of GEV. Different light spectra and availability of macro and micronutrients affect vegetative growth, production of photosynthesizing pigments, proteins and total cardenolide, and GEV levels in *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.

Keywords: Missing elements. Spectral quality of light. Glucoevatromonoside. Foxglove.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Hábito de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.....20

Figura 2 - Estruturas químicas de cardenolídeos isolados de *D. mariana* ssp. *Heywoodii*.25

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 1 - Curva-padrão de soro albumina bovina (BSA), com coeficiente linear (R^2).92

Figura 2 - Qualidade do modelo demonstrada pelo resíduo *versus* número de casos.....99

Figura 3 - Resposta experimental em função da resposta prevista pelo modelo proposto... 101

Figura 4 - Gráfico de contorno com as respostas em áreas previstas pelo modelo para a variável razão-droga-vegetal por solvente extrator (X_1 /mg/mL) *versus* tempo de maceração assistida por ultrassom (X_2 /min). Lavras, MG, 2021. 102

Figura 5 - Gráfico de contorno com as respostas em áreas previstas pelo modelo para a variável quantidade de droga vegetal (X_1 mg⁻¹) *versus* número de ciclos (X_3). Lavras, MG, 2021..... 103

Figura 6 - Gráfico de contorno com as respostas em áreas previstas pelo modelo para a variável, tempo de maceração assistida por ultrassom (X_2 min⁻¹) *versus* número de ciclos (X_3). Lavras, MG, 2021..... 104

Figura 7 - Cromatogramas representativos de cada ciclo de extração referente aos experimentos de otimização extrativa. Para a avaliação de resultados compare com a Tabela 25..... 105

Figura 8 - Cromatogramas obtidos pelo detector PDA e de massas no modo positivo e negativo para a análise de GEV..... 107

Figura 9 - Espectro de UV/DAD obtido para GEV..... 107

Figura 10 - Principais fragmentos obtidos no espectro de massas de GEV no modo negativo SCAN..... 108

Figura 11 - Espectro Massas no modo SCAN negativo obtido para GEV..... 108

Figura 12 - Principais fragmentos obtidos no espectro de massas de GEV no modo positivo SCAN..... 109

Figura 13 - Espectro Massas no modo SCAN positivo obtido para GEV. 109

Figura 14 - Cromatogramas obtidos pelo detector UV/DAD nos extratos de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i>	110
Figura 15 - Cromatogramas obtidos pelo detector de massas MS/MS no negativo sobre monitoramento do fragmento 665 referente [M - H] ⁻ da estrutura GEV (MM= 666 Da).	110
Figura 16 - Espectro obtido, a partir do pico com tempo de retenção de 12,4 min, mostrando fragmento característico da presença de GEV nos extratos de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i>	111
Figura 17 - Teor médio (n=6) de GEV durante a avaliação da estabilidade química do extrato de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i>	113
Figura 18 - Overlay do perfil cromatográfico entre padrão (GEV), amostra e amostra enriquecida com GEV. Condições de preparo de amostra e condição cromatográfica vide item 2.2.5 e 2.2.6, respectivamente.	114
Figura 19 - Curvas analíticas e média das curvas obtidas por CLAE-FR, em três dias consecutivos para GEV.....	117
Figura 20 - Influência da variação na condição cromatográfica na robustez do método para o extrato das folhas de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> (n=6). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05)	123
Figura 21 - Plantas de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> cultivadas a pleno sol, malha azul, vermelha e preta, após 120 dias. Lavras, MG, 2021.....	128
Figura 22 - Análise de componentes principais (PCA) da correlação matricial entre crescimento vegetativo, pigmentos fotossintetizantes, proteína solúveis totais, cardenolídeos totais e glicoevatromonosídeo (GEV) com as malhas coloridas azul, vermelha, preta e tratamento a pleno sol.....	135

ARTIGO 2

Figura 1 - Curva-padrão de soro albumina bovina (BSA), com coeficiente linear (R ²).	156
Figura 2 - Plantas de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> cultivadas nas diferentes soluções nutritivas.	161
Figura 3 - Análise de componentes principais (PCA) da correlação matricial entre crescimento vegetativo, pigmentos fotossintetizantes, proteína solúveis totais, cardenolídeos totais e glicoevatromonosídeo (GEV) com as malhas coloridas azul, vermelha, preta e tratamento a pleno sol.....	169

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Classificação sistemática do gênero <i>Digitalis L</i>	19
---	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Características químicas de amostras dos solos utilizados (camada de 0 a 0,2 m de profundidade). Lavras, MG, 2021.	69
Tabela 2 - Matriz experimental codificada do planejamento das misturas de extração para <i>Digitalis mariana ssp. heywoodii</i> . Lavras, MG, 2021.....	71
Tabela 3 - Planejamento fatorial completo 2 ⁴ com o total de ensaios e os fatores <i>X1</i> , <i>X2</i> , <i>X3</i> e <i>X4</i> codificados em níveis +1 e -1. Lavras, MG, 2020.....	72
Tabela 4 - Planejamento composto central e os fatores <i>X1</i> , <i>X2</i> e <i>X3</i> codificados em cinco níveis -1, -1,68, 0, 1 e 1,68 e sem codificações. Lavras, MG, 2021.....	73
Tabela 5 - Gradiente linear de eluição empregado para o registro dos perfis cromatográficos exploratórios por CLAE-DAD. Lavras, MG, 2021.	75
Tabela 6 - Condições cromatográficas avaliadas, durante o desenvolvimento do método por CLAE-DAD, para a análise de GEV nas folhas de <i>Digitalis mariana ssp. heywoodii</i> . Lavras, MG, 2021.....	76
Tabela 7 - Gradiente de eluição estabelecido para a identificação de GEV nos extratos de <i>Digitalis mariana ssp. heywoodii</i>	78
Tabela 8 - Condições espectroscópicas definidas para a análise do perfil fitoquímico dos extratos.....	79
Tabela 9 - Parâmetros utilizados para a condição cromatográfica por CLAE-DAD estabelecida, para a quantificação de GEV, em extrato de <i>Digitalis mariana ssp. heywoodii</i> . Lavras, MG, 2021.	81
Tabela 10 - Programa de eluição estabelecido, para a quantificação de GEV, em extrato de <i>Digitalis mariana ssp. heywoodii</i> . Lavras, MG, 2021.	81
Tabela 11 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas, para a construção da curva analítica, conforme a concentração da solução de referência. Lavras, MG, 2021.....	83

Tabela 12 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas da solução de referência para a determinação dos limites de quantificação de GEV.	84
Tabela 13 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas da solução de referência para a determinação dos limites de quantificação e detecção de GEV.	84
Tabela 14 - Correspondência entre o volume e a massa da solução de referência de GEV adicionada às folhas de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> na determinação da exatidão de GEV. Lavras, 2021.	86
Tabela 15 - Níveis de variação dos parâmetros cromatográficos na robustez do método por CLAE-FR. Lavras, MG, 2021.	86
Tabela 16 - Condição cromatográfica estabelecida para a quantificação de GEV em extrato de folhas de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i>	91
Tabela 17 - Mistura de solventes (metanol, etanol e água), com suas respectivas áreas do pico do glicoevatromonosídeo (GEV) e valor de similaridade espectral. Lavras, MG, 2021.	94
Tabela 18 - Estimativa das variáveis (metanol, etanol e água) em relação ao seu coeficiente, erro, valor de p e limites dos coeficientes. Lavras, MG, 2021.	94
Tabela 19 - ANOVA do modelo linear. Lavras, MG, 2021.	95
Tabela 20 - Variáveis X_1 , X_2 , X_3 e X_4 e suas respectivas áreas e número de ciclos. Lavras, MG, 2021.	96
Tabela 21 - Estimativa das variáveis em relação ao seu efeito, valor de p e limites dos coeficientes. Lavras, MG, 2021.	97
Tabela 22 - Tabela dos efeitos do modelo recalculado para a resposta área do pico de GEV. Lavras, MG, 2021.	98
Tabela 23 - Fatores e suas possíveis interações em relação ao seu efeito, valor de p e limites dos coeficientes. Lavras, MG, 2021.	100
Tabela 24 - ANOVA aplicada à confiabilidade dos modelos gerados e suas interações.	100
Tabela 25 - Tempo de retenção, área e pureza do pico de GEV representativo de cada ciclo de extração.	106
Tabela 26 - Condição extrativa para o preparo de amostras de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> para a quantificação de GEV por CLAE-DAD.	106
Tabela 27 - Parâmetros da adequabilidade do sistema para o pico correspondente ao GEV, empregando na condição cromatográfica estabelecida e valores recomendados por Bose (2014).	112

Tabela 28 - Resultados da seletividade para a validação analítica de GEV no extrato de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> .	114
Tabela 29 - Parâmetros da adequabilidade do sistema para o pico correspondente ao GEV, empregando na condição cromatográfica estabelecida e valores recomendados por Bose (2014).	115
Tabela 30 - Massa injetada, áreas médias ($n=3$) e desvio-padrão relativo dos pontos das curvas analíticas, obtidas nos três dias de análise. Condições cromatográficas vide item 2.2.6.	116
Tabela 31 - Dados de regressão linear para as curvas analíticas de GEV, em três dias consecutivos de análise.	116
Tabela 32 - Limites de quantificação e detecção determinados com base nos parâmetros das curvas analíticas obtidas. Condições cromatográficas vide item 2.6.3.1.	118
Tabela 33 - Limites de quantificação e detecção determinados experimentalmente. Condições cromatográficas vide item 2.6.3.1.	118
Tabela 34 - Teor de GEV e desvio-padrão relativo observados na determinação da repetibilidade de amostras de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> na condição cromatográfica estabelecida.	119
Tabela 35 - Teor de GEV e desvio-padrão relativo observados na determinação da precisão intermediária de amostras de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> na condição cromatográfica estabelecida.	120
Tabela 36 - Valores de recuperação de GEV (média, $n=3$).	122
Tabela 37 - Número de folhas (NF), comprimento de raiz (CR), massa seca de folha (MSF), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST), relação raiz/parte aérea (R/PA) e área foliar de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> submetidas a diferentes condições de luminosidade com 120 dias. Lavras, MG, 2021.	124
Tabela 38 - Clorofila <i>a</i> e <i>b</i> , clorofila total, carotenoides e relação <i>a/b</i> de plantas de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> submetidas a diferentes condições de luminosidade com 120 dias. Lavras, MG, 2021.	130
Tabela 39 - Efeito dos diferentes tratamentos, tela azul, vermelha e preta, no teor de proteínas solúveis totais (mg mL^{-1}) e na produção de cardenolídeos totais ($\text{g}/100 \text{ g}$ de folha seca) e GEV ($\mu\text{g}/100\text{g}$ de folha seca). Lavras, MG, 2020.	132

ARTIGO 2

Tabela 1 - Condição cromatográfica estabelecida para a quantificação de GEV em extrato de folhas de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i>	158
Tabela 2 - Comprimento de raiz (CR), matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST) e relação parte/aérea/raiz (PA/R) de plantas de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> . Lavras, MG, 2022.....	159
Tabela 3 - Comprimento de folha e largura de folha de plantas jovens de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> cultivadas em solução nutritiva com omissão de macronutrientes e micronutrientes. Lavras, MG, 2021.	164
Tabela 4 - Clorofila <i>a</i> e <i>b</i> , clorofila total, carotenoides e relação <i>a/b</i> de plantas jovens de <i>Digitalis mariana</i> ssp <i>heywoodii</i> cultivadas em solução nutritiva com omissão de macronutrientes e micronutrientes. Lavras, MG, 2021.....	164
Tabela 5 - Efeito da omissão de macronutrientes e micronutrientes no teor de proteínas totais (mg mL ⁻¹), cardenolídeos totais (g/100g de folhas secas) e acúmulo de GEV (µg/100g de folhas secas) de plantas de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> . Lavras, MG, 2021.....	166

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	16
1	INTRODUÇÃO GERAL	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Aspectos gerais do gênero e da espécie	19
2.2	Aspectos gerais da <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i>	23
2.3	Aspectos Agronômicos da espécie	27
2.4	Omissão de nutrientes	31
2.5	Cultivo em malhas coloridas	37
2.6	Validação de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	42
	REFERÊNCIAS	46
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	64
	ARTIGO 1 - VALIDAÇÃO ANALÍTICA, ACÚMULO DE CARDENOLÍDEOS TOTAIS E GLICOEVATROMONOSÍDEO E CRESCIMENTO VEGETATIVO DE <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> SOB MALHAS FOTOCONVERSoras	64
1	INTRODUÇÃO	67
2	MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1	Material vegetal para estudos de desenvolvimento e validação analítica	69
2.2	Otimização extrativa	70
2.2.1	Planejamento simplex-centroide	71
2.2.2	Planejamento Fatorial Completo: seleção dos parâmetros extrativos	72
2.2.3	Planejamento Composto Central (PCC): ajuste fino dos parâmetros selecionados	73
2.2.4	Análises dos perfis cromatográficos por CLAE-FR	74
2.2.5	Preparo dos extratos	74
2.2.6	Preparo das amostras	75
2.2.7	Equipamento e condições cromatográficas para a obtenção dos perfis exploratórios	75
2.3	Desenvolvimento das condições cromatográficas	76
2.4	Identificação de glicoevatromonosídeo (GEV) nos extratos de <i>Digitalis mariana</i> Boiss. ssp. <i>heywoodii</i> (P. Silva and M. Silva) Hinz por técnicas cromatográficas hifenadas	77
2.5	Análises cromatográficas por CLUE-DAD-EM	78
2.6	Validação do método analítico por CLAE-DAD	80
2.6.1	Preparo de amostras	80
2.6.2	Preparo das soluções de referências	80
2.6.3	Validação analítica	80
2.6.3.1	Parâmetros utilizados na condição cromatográfica estabelecida	80
2.6.3.2	Teste de Adequabilidade do Sistema	81
2.6.3.3	Estabilidade Química	82
2.6.3.4	Seletividade	82
2.6.3.5	Linearidade	82
2.6.3.6	Limite de quantificação	83
2.6.3.7	Limite de detecção	84
2.6.3.8	Precisão	85

2.6.3.9	Exatidão.....	85
2.6.3.10	Robustez.....	86
2.7	Análises estatísticas.....	86
2.8	Cultivo de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> sob malhas fotoconversoras e obtenção das mudas.....	87
2.9	Determinação do crescimento vegetal.....	87
2.10	Quantificação de pigmentos fotossintetizantes.....	88
2.11	Análises quantitativas de cardenolídeos totais.....	89
2.11.1	Extração de cardenolídeos.....	89
2.11.2	Reação de coloração e leitura das absorbâncias.....	89
2.11.3	Doseamento dos cardenolídeos totais.....	90
2.11.4	Quantificação de glicoevatromonosídeo.....	90
2.11.5	Determinação de proteínas totais.....	91
2.12	Análise estatística.....	92
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	93
3.1	Otimização extrativa.....	93
3.1.1	Planejamento simplex-centroide.....	93
3.1.2	Planejamento Fatorial completo.....	95
3.1.3	Planejamento Composto Central (ajuste fino dos resultados).....	99
3.1.4	Desenvolvimento de método por CLAE-DAD para a quantificação de GEV em folhas de <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i>	106
3.1.5	Identificação de glicoevatromonosídeo (GEV) nos extratos de <i>Digitalis mariana</i> Boiss. ssp. <i>heywoodii</i> (P. Silva and M. Silva) Hinz por técnicas cromatográficas hifenadas.....	107
3.1.6	Validação do método cromatográfico.....	111
3.1.6.1	Adequabilidade do Sistema.....	111
3.1.6.2	Estabilidade Química.....	112
3.1.6.3	Seletividade.....	113
3.1.6.4	Linearidade.....	115
3.1.6.5	Limites de quantificação e detecção.....	117
3.1.6.6	Precisão.....	119
3.1.6.7	Exatidão.....	120
3.1.6.8	Robustez.....	123
3.2	Determinação do crescimento vegetal.....	124
3.3	Quantificação de pigmentos fotossintetizantes.....	129
3.4	Determinação de proteínas totais.....	132
3.5	Análises quantitativas de cardenolídeos e GEV.....	133
3.6	Análise dos Componentes principais (PCA).....	135
4	CONCLUSÃO.....	137
	REFERÊNCIAS.....	138
	ANEXO A - DISTRIBUIÇÃO NORMAL DO RESÍDUO.....	149
	ARTIGO 2 - CULTIVO DE <i>Digitalis mariana</i> ssp. <i>heywoodii</i> SOB OMISSÃO DE NUTRIENTES EM SISTEMA HIDROPÔNICO.....	150
1	INTRODUÇÃO.....	153
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	154
2.1	Localização do experimento e obtenção das mudas.....	154
2.2	Determinação do crescimento vegetal.....	155
2.3	Quantificação de pigmentos fotossintetizantes.....	155
2.4	Determinação de proteínas totais.....	156
2.5	Análises quantitativas de cardenolídeos.....	157

2.5.1	Doseamento de cardenólídeos totais	157
2.5.2	Quantificação de glicoevatromonosídeo (GEV).....	157
2.6	Análise estatística	158
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	159
3.1	Avaliação do crescimento vegetal	159
3.2	Quantificação de pigmentos fotossintetizantes	164
3.3	Determinação de proteínas totais.....	166
3.4	Análises quantitativas de cardenólídeos totais e GEV.....	167
3.5	Análise dos Componentes principais (PCA)	168
4	CONCLUSÃO	170
	REFERÊNCIAS	171

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Planta medicinal é toda planta ou partes dela que contenham as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2017). Tais plantas devem ser usadas, manipuladas e beneficiadas de forma adequada, para garantir seu valor medicinal, pois, mesmo quando há essa adequabilidade, podem apresentar riscos de intoxicação, bem como o surgimento de efeitos colaterais. Com isso, é de extrema importância conhecer bem a planta medicinal utilizada, sua fitoquímica, atividades biológicas, aspectos agrônômicos de cultivo, secagem e beneficiamento, entre outros, para evitar danos ao bem-estar humano e preservar a qualidade da espécie, seja qual for sua finalidade de uso (BADKE *et al.*, 2012).

A demanda por plantas medicinais e aromáticas como matérias-primas, na produção de produtos farmacêuticos, agroalimentares, cosméticos naturais e perfumes, tem crescido nos últimos anos (LI; WANG, 2021). Entretanto a taxa de crescimento do vegetal e o teor dos produtos naturais produzidos podem ser afetados significativamente pelas condições ambientais sob as quais as plantas são cultivadas. Assim, a disponibilidade de nutrientes representa um fator-chave na determinação da taxa biossintética e acúmulo de metabólitos secundários (ALVARENGA *et al.*, 2015). Os macro e micronutrientes essenciais no crescimento e desenvolvimento das plantas estão envolvidos, em numerosos processos fisiológicos, incluindo a respiração, fotossíntese e a formação da parede celular. Esses nutrientes fornecem os cofatores requeridos por numerosas enzimas do metabolismo primário e secundário, e a disponibilidade limitada ou ausência de um nutriente podem induzir alterações na biossíntese e/ou na capacidade catabólica do metabolismo vegetal (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Nesse contexto, pelo seu impacto sobre a morfogênese, a luz é um fator ambiental-chave que altera o crescimento e desenvolvimento de plantas. Diferentes regimes de luz provocam mudanças fisiológicas e morfológicas nas plantas, e seu potencial medicinal vai depender de sua adaptação a essas condições (RESENDE *et al.*, 2011). Entre as várias condições de cultura, o regime de luz, incluindo a intensidade e os espectros de luz, têm sido apontados por ser um dos fatores-chave que influenciam o acúmulo de metabólitos secundários (SÁEZ *et al.*, 2003).

No que tange ao cultivo em campo, muitos pesquisadores e produtores têm optado pela utilização de telas de sombreamento coloridas, principalmente nas cores azul, vermelho e preto em diferentes taxas de transparência. Essas telas, além de controlarem fatores como temperatura e umidade, fazem com que o comprimento de onda e a quantidade de energia incidente sejam

alterados em benefício das plantas. Essas telas, obtidas comercialmente, têm proporcionado respostas de crescimento e produção de metabólitos secundários em diferentes espécies vegetais (HENRIQUE *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2016; OREN-SHAMIR *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2011).

Espécies do gênero *Digitalis* L. (do latim: “dedo de uma luva”, em referência ao formato de suas flores), popularmente conhecidas como “Dedaleira”, têm sido empregadas há mais de 200 anos no tratamento de insuficiência e arritmia cardíaca. As plantas desse gênero são a principal fonte de heterosídeos cardiotônicos (HCs) do tipo cardenolídeos, sendo esses os responsáveis pela maior parte de suas propriedades farmacológicas e aplicações terapêuticas. Apesar dessa proeminente propriedade cardiovascular, atualmente, os HCs não ocupam posição de destaque no mercado de medicamentos. Ainda assim, continua existindo um grande interesse comercial nas espécies de *Digitalis* e seus cardenolídeos, pelo potencial comprovado no tratamento de diferentes tipos de câncer e infecções virais (BERTOL *et al.*, 2011; KREIS, 2017; KRISHNA *et al.*, 2015; NEWMAN; YANG; PAWLUS, 2008; SCHNEIDER *et al.*, 2018; SU *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008).

Digitalis mariana ssp. *heywoodii* (P. Silva & M. Silva) Hinz é uma subespécie endêmica de Portugal (Alto Alentejo) e da Espanha (Badajoz, Cordoba, Jaén - Província Luso-Extremadurensis, Setor Mariânico-Monchiquense) (VALDÉS; TALAVERA; FERNANDÉZ-GALIANO, 1987). Essa subespécie é uma fonte natural do glicoevatromonosídeo (GEV), com teor aproximado de 0,15% (BERTOL *et al.*, 2011; KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015; LUCKNER; WICHTL, 2000). O GEV é um potencial agente antiviral, que, ao inibir o vírus VHS-1, aciclovir-resistente, demonstrou possuir mecanismo antiviral distinto e, desta forma, podendo representar uma nova classe de fármaco antiviral (BERTOL *et al.*, 2011; MUNKERT *et al.*, 2017).

Assim como outras espécies do gênero *Digitalis*, a espécie *D. mariana* ssp. *heywoodii* ainda carece de estudos tanto do ponto de vista farmacológico, quanto agrônômico (NAVARRO *et al.*, 2000; PATIL *et al.*, 2013). Em virtude do seu interesse farmacêutico, faz-se necessária a produção vegetal com essa subespécie, a fim de buscar o entendimento de processos que regulam o ciclo biossintético do GEV, visando à sua máxima síntese nesse vegetal.

Outro aspecto de extrema importância, na influência do desenvolvimento de todas as espécies, é a adubação, pois alguns elementos são essenciais ao desenvolvimento das plantas como os macronutrientes, nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) e os micronutrientes boro (B), cloro (Cl), molibdênio (Mo), cobre (Cu), ferro (Fe),

zinco (Zn) e manganês (Mn). Assim, o aparecimento de alguns sintomas que são característicos de cada elemento químico, podem sinalizar, por exemplo, deficiências minerais específicas (FAQUIN; ANDRADE, 2004).

Neste contexto, avaliar as implicações no crescimento vegetativo e teores de cardenolídeos totais e glicoevatromonosídeo (GEV), em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* cultivadas sob diferentes malhas coloridas e submetidas à omissão de macro e micronutrientes, possivelmente, apontarão quais são as condições de manejo fitotécnico adequado para a máxima produtividade agrícola e da produção de compostos de interesse farmacêutico para essa espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais do gênero e da espécie

As espécies do gênero *Digitalis* L. possuem dois centros de diversidade: Península Ibérica e Noroeste da África; e Península dos Balcãs e partes da Ásia (CLEMENTE *et al.*, 2011; KREIS, 2017). Algumas foram introduzidas como plantas ornamentais, em diferentes partes do mundo, sendo também encontradas, por exemplo, nos Estados Unidos, Alemanha, Canadá e Nova Zelândia (BETTINGER, 2020; NAZIR; RESHI; WAFAI, 2008). Tradicionalmente esse gênero pertencia à família Scrophulariaceae Juss., entretanto, em função de estudos de filogenia molecular (OLMSTEAD *et al.*, 2001), hoje é classificada como um gênero pertencente à família Plantaginaceae (SERRANO *et al.*, 2014) (TABELA 1).

Tabela 1 - Classificação sistemática do gênero *Digitalis* L.

Taxonomia	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Lamiales
Família	Plantaginaceae
Gênero	<i>Digitalis</i> L.

Fonte: Adaptado de Serrano *et al.* (2014).

Todas as espécies do gênero *Digitalis* são plantas herbáceas bienais ou perenes. São pequenos arbustos com folhas simples e alternadas, em geral, dispostas em rosetas. A corola, tubular cilíndrica ou tubo-globulosa é frequentemente pequena na base com limbo, contendo dois lábios, cujo lábio superior é de regra mais curto que o inferior. As flores são zigomorfas e dispostas em racemos terminais, e suas brácteas variam de cor, conforme a espécie, do roxo ao rosa, branco e amarelo (BRÄUCHLER; MEIMBERG; HEUBL, 2004; CLEMENTE *et al.*, 2011) (FIGURA 1).

Figura 1 - Hábito de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.



Fonte: Google Imagens (2021).

As espécies do gênero *Digitalis* possuem o nome vernacular "dedaleira" (em inglês: *Foxglove*). Esse gênero engloba 20 espécies, incluindo *D. ferruginea* L. ssp. *schischkinii*, *D. thapsi* L.; *D. trojana* Ivan, *D. lanata* Ehrh, *D. purpurea* L., entre outras. Entre essas espécies, apenas duas espécies, *D. lanatae* e *D. purpurea*, são economicamente importantes (CLEMENTE *et al.*, 2011).

A constituição química desse gênero é bem conhecida, possibilitando inclusive o desenvolvimento de estudos quimiotaxonômicos (TASKOVA; GOTFREDSEN; JENSEN, 2005). As principais classes de metabólitos secundários, já relatados em espécies do gênero *Digitalis*, encontram-se: a) esteroides como: os heterosídeos cardiotônicos, saponinas esteroidais e esteróis; b) substâncias fenólicas tais como: antraquinonas, feniletanoides e flavonoides (GANAPATY *et al.*, 2003; KREIS, 2017). De fato, as espécies desse gênero são a principal fonte de heterosídeos cardiotônicos (HCs) ou digitálicos do tipo cardenolídeos, como a digoxina e digitoxina (FIGURA 2).

Os heterosídeos digitálicos caracterizam o gênero em questão, sendo responsáveis pela maior parte de suas propriedades farmacológicas e aplicações terapêuticas, despertando, assim, grande interesse no âmbito da pesquisa e da indústria farmacêutica (CLEMENTE *et al.*, 2011; KRISHNA *et al.*, 2015; PATIL *et al.*, 2013).

Quimicamente, os heterosídeos digitálicos são caracterizados por um núcleo esteroidal com seus anéis posicionados em *cis-trans-cis*, possuindo um grupo 14 β -hidroxila e a substituição do C-17 β por um anel lactônico pentagonal α , β insaturado. Na posição 3 β , está ligada a uma cadeia lateral de açúcar com até cinco unidades de carboidrato, contendo glicose e vários açúcares raros de 6-desoxi, 2,6-didesoxi e 6-desoxi-3-metoxi, tais como D-fucose, D-digitoxose ou D-digitalose. As agliconas esteroidais ou geninas são de dois tipos: cardenolídeos (esqueleto carbônico contendo 23 átomos de carbono) ou bufadienolídeo (esqueleto carbônico contendo 24 átomos de carbono). O anel lactônico de cinco membros é o que caracteriza a genina dos cardenolídeos, sendo seu homólogo caracterizado pela presença de um anel lactônico duplamente insaturado de seis membros na mesma posição do anel esteroidal (DEWICK, 2009). Por sua estrutura química complexa, sua síntese química, em escala industrial, é inviável. Dessa forma, eles são obtidos de folhas de espécies de *Digitalis*, cuja concentração varia de 0,5% a 1,5% (LUCKNER; WICHTL, 2000).

Cerca de 80 tipos diferentes de cardenolídeos são encontrados em espécies do gênero *Digitalis*, agrupados de acordo com sua aglicona em: digitoxigenina, digoxigenina, gitoxigenina, gitaloxigenina, diginatigenina, oleandrigenina, uzarigenina, xismalogenina e canarigenina (KREIS, 2017; KREIS; HENSEL; STUHLEMMER, 1998; LUCKNER; WICHTL, 2000). Mais de 30 cardenolídeos, estruturalmente diferentes, já foram isolados e relatados nas folhas e sementes de *D. purpurea*, com teores variando pela influência de fatores bióticos e abióticos, incluindo o local de coleta, período de desenvolvimento (idade) da planta, macro e micronutrientes, além de diversos outros fatores macro e micro ambientais (ATKINSON *et al.*, 2012; GANAPATY *et al.*, 2003; KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015; OH *et al.*, 2005). Em folhas secas com 1(um) ano de idade, em estágio vegetativo, pode-se acumular aproximadamente de 0,4 a 1% de cardenolídeos totais, enquanto, no estágio de florescimento, o acúmulo gira em torno de 0,3 a 0,8% de cardenolídeos totais na matéria seca das folhas (KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015).

Os principais cardenolídeos encontrados na espécie *Digitalis lanata* são os purpureaglicosídeo A e B e a glicogitaloxina. No entanto encontra-se, também, mas em pequenas quantidades, outros compostos digitálicos, como o digitalinum verum, glicoverodoxina, digitoxina, gitaloxina, gitoxina, glicoevatromonosídeo, glicolanadoxina, glicogitorósido, estropsídeo, verodoxina e glicogitaloxigenina bis-digitoxosídeo, além de antranídeos, saponinas, digitanol e outros compostos secundários (CLEMENTE *et al.*, 2011). Oh *et al.* (2005) isolaram, a partir das folhas de *Digitalis purpurea*, quatro glicosídeos feniletanóides diferentes: purpureasídeo A, desramnosil acteosídeo, calceolariosídeo B e

plantainosídeo D. Jin *et al.* (2011), também, isolaram e elucidaram a estrutura química de dois novos glicosídeos fenilatanóides na espécie, purpureasídeo D e purpureasídeo E.

A espécie *Digitalis lanata* apresenta 0,9-1,5% de cardenolídeo total, em seu peso seco, sendo os principais constituintes o lanatosídeo C, lanatosídeo A, glicolanadoxina, digitalinum verum, glicogitorosídeo, glicoverodoxina e glicoevatromonosídeo (CLEMENTE *et al.*, 2011). A análise por CLAE-UV de extratos de indivíduos da espécie *Digitalis lanata* micropropagados detectou a presença de digoxigenina, deacetillanatosídeo C, lanatosídeo C, digoxina (série C), digitoxigenina, desacetil-lanatosídeo A e digitoxina (série A) (VELA *et al.*, 1991). Um estudo recente com propagação *in vitro* de brotos e regeneração de plântulas via calos demonstrou a presença de purpureaglicosídeo A, glicoevatromonosídeo, lanatosídeo A, digitoxina, evatromonosídeo, α -acetildigitoxina em *D. mariana* ssp. *heywoodii* (KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015).

O uso de extratos dessas espécies, para o tratamento de doenças cardíacas, foi relatado pela primeira vez por William Withering em 1785 (WITHERING, 2014). Calcula-se que 15 milhões de pessoas, em todo o mundo, sofrem de insuficiência cardíaca (BRAGA; VIRIATO, 2010; SINGH; ROUTLEDGE, 2020), o que torna importante o estudo e desenvolvimentos de novos medicamentos oriundos de fontes naturais, tais como das espécies do gênero *Digitalis*, para atender este mercado consumidor.

Além dos usos clínicos convencionais dos cardenolídeos, pesquisas têm apontando outras atividades biológicas importantes aos extratos das folhas de *Digitalis* ssp, em que a maioria dos estudos relatou que esses extratos apresentam promissoras atividades biológicas, tais como as atividades: antimicrobiana para *D. lamarckii* Ivan (ANAND *et al.*, 2019; BENLI *et al.*, 2009; ORCZYK; WOJCIECHOWSKI; BREZESINSKI, 2020; VISHNUVARTHANAN; RAJESWARI, 2019); antioxidante para *D. lamarckii*, *D. trojana*, *D. davisiana* e *D. cariensis* (CINGOZ; VERMA; GUREL, 2014); antitumoral para *D. purpurea* (JIN *et al.*, 2011; LÓPEZ-LÁZARO *et al.*, 2003), bem como a presença de atividade diurética e anti-urolitíase para os extratos brutos de *D. purpurea* (FARAH *et al.*, 2015).

Os estudos antitumorais iniciaram com Stenkvist *et al.* (1982), os quais observaram que mulheres sob terapia digitalica, após mastectomia, apresentavam 9,6 vezes menos recorrência que aquelas que não fizeram uso dessa terapia. Depois disso, numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* verificaram esses achados iniciais para diferentes tipos de câncer (KULIKOV *et al.*, 2007; LINDHOLM *et al.*, 2002; LÓPEZ-LÁZARO, 2007; MEKHAIL *et al.*, 2006; MIJATOVIC *et al.*, 2006, 2007; NEWMAN; YANG; PAWLUS, 2008; PLATZ *et al.*, 2011; WINNICKA; BIELAWSKI; BIELAWSKA, 2006).

A partir do extrato alcoólico das sementes de *Digitalis purpurea*, foram isolados quatro glicosídeos cardiotônicos (glicodigifucoside, 3'-O-acetilglicoevatromonoside, digitoxigenin 3-O-β-D-glicopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranosil-(1→4)-3-O-acetil-β-D digitoxopiranosídeo e purpureaglicosídeo). Além disso, esses autores verificaram que os compostos isolados apresentaram uma potente atividade citotóxica contra a linha celular de adenocarcinoma renal humano, com valores de IC₅₀ significativamente mais baixos que contra a linha celular derivada do túbulo proximal humano normal (FUJINO *et al.*, 2015). Desta forma, Fujino *et al.* (2015) concluíram que os glicosídeos cardiotônicos citados exerceram uma ação anticâncer sobre as células tumorais renais. Existe também na literatura um possível uso de digitoxina, bem como outros glicósidos cardíacos em quimioterapia, para tratamentos de câncer de próstata e mama (NEWMAN; YANG; PAWLUS, 2008).

A espécie como um todo é considerada tóxica, incluindo as raízes e sementes (PATIL *et al.*, 2013). Diversos relatos comprovam sua ação de envenenamento e toxicidade no organismo humano (CARDANO *et al.*, 2002; JANSSEN; BERG; OVAKIM, 2016; KRAVCHENKO *et al.*, 2018; LACASSIE *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2010; MITCHELL, 2010; RAMLAKHAN; FLETCHER, 2007; SAEVA; ATANASOV, 2014; SCHEINOST, 2001; SLAUGHTER *et al.*, 2012), e a ingestão acidental da planta por adultos e crianças (embora mais raro) ocorre, muitas vezes, por confundi-las com espécies semelhantes anatomicamente, como, por exemplo, *Borago officinalis* L. (Boraginaceae, borragem) (BONFANTI *et al.*, 2016) e *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae, comfrei) (WU *et al.*, 2017). Além disso, as toxinas presentes nas espécies do gênero *Digitalis* podem gerar alterações nas atividades gastrointestinais, cardiotoxicidade, atividade pró-convulsiva ou efeitos alucinógenos ou dermatológicos (FUJINO *et al.*, 2015; SINGH; ROUTLEDGE, 2020).

Portanto derivados cardenolídicos presentes em plantas de *Digitalis* ssp. são responsáveis por diversas atividades biológicas, químicas e fitoquímicas demonstrando o grande potencial medicinal desse gênero.

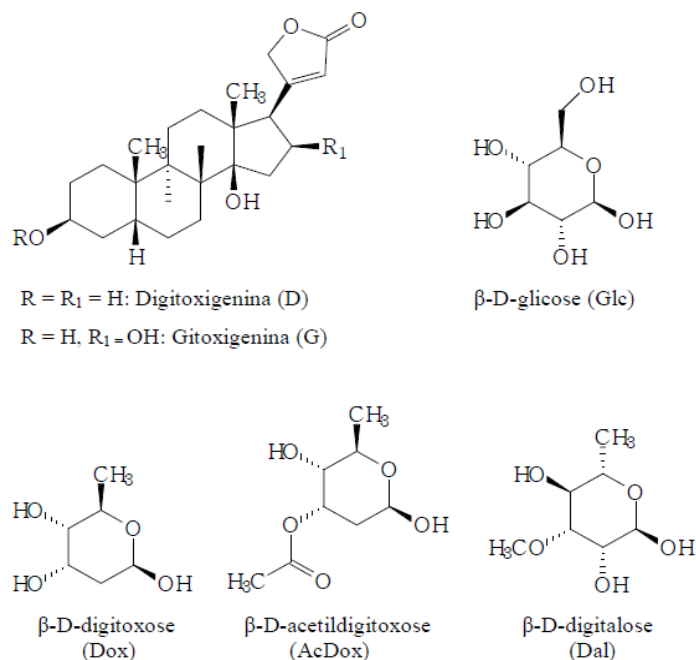
2.2 Aspectos gerais da *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*

Conforme citado por Serrano *et al.* (2014), *Digitalis purpurea* é representada por três subespécies: *Digitalis purpurea* L. ssp. *purpurea* var. *purpurea*, *Digitalis purpurea* L. ssp. *mariana* Rivas Goday e *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* P. Silva & M. Silva. Esta subespécie de *Digitalis* é endêmica de Portugal (Alto Alentejo) e Espanha (Badajoz, Cordoba, Jaén - Província Luso-Extremadurensis, Setor Mariânico-Monchiquense) (VALDÉS; TALAVERA;

FERNANDÉZ-GALIANO, 1987). Segundo Navarro *et al.* (2000), existem diferenças botânicas e fitoquímicas entre *D. mariana* ssp. *heywoodii* e *D. purpurea*. Com relação à sua botânica, *D. mariana* ssp. *heywoodii* (FIGURA 1) apresenta caules de 40 a 140 cm, folhas basais oval-lanceoladas, densamente branco-lanosas, particularmente na parte inferior, com tricomas curtos e compridos glandulares. As brácteas são lanceoladas, ligeiramente mais longas ou mais curtas que os pedicelos. Pedicelos com indumento de tricomas não glandulares são mais longos que o diâmetro do pedicelo e tricomas glandulares mais curtos que o diâmetro do pedicelo. Suas sépalas são pubescentes-glandulares, corola 35 a 42 mm, branco, por vezes, com a margem rosa, com pontos roxos muito pequenos na parte inferior interna (WHAYNE, 2018).

Em se tratando das diferenças fitoquímicas da espécie *D. mariana* ssp. *heywoodii*, é considerada uma subespécie de *D. purpurea*, por apresentar diferenças no perfil químico dos glicosídeos produzidos (LUCKNER; WICHTL, 2000).

A presença de glicosídeos cardiotônicos, em folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, foi descrito, em 1963, com o isolamento de oito compostos: lanatosídeo A, lanatosídeo B, purpúrea glicosídeo A, purpúrea glicosídeo B, glicoevatromonosídeo (GEV), glicolanatosídeo, *Digitalium verum* e estrospeídeo (DANIEL, 2006; LUNGEANU; CALCANDI; CALCANDI, 1963; NAVARRO *et al.*, 2000). Nessa espécie, destaca-se a presença da monodigitoxigenina GEV, com teor aproximado de 0,15% (BERTOL *et al.*, 2011; KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015; LUCKNER; WICHTL, 2000; NAVARRO *et al.*, 2000). A estrutura química dos cardenolídeos digitálicos isolados de *D. mariana* ssp. *heywoodii* estão representadas na Figura 2.

Figura 2 - Estruturas químicas de cardenolídeos isolados de *D. mariana* ssp. *Heywoodii*.

Possíveis ligações	Estrutura molecular
Lanatosídeo A	D-(Dox-Dox-AcDox-Glc)
Lanatosídeo B	G-(Dox-Dox-AcDox-Glc)
Purpureaglicosídeo A	D-(Dox-Dox-Dox-Glc)
Purpureaglicosídeo B	G-(Dox-Dox-Dox-Glc)
Glicoevatromonosídeo	D-(Dox-Glc)
Evatromonosídeo	D-(Dox)
Digitaliumverum	G-(Dal-Glc)
Estrospeídeo	G-(Dal)

Fonte: Adaptado de Daniel (2006), Kreis, Haug e Yücesan (2015) e Navarro *et al.* (2000).

O GEV é um derivado natural 4'-glicosilado do evatromonosídeo (EV, digitoxigeninamonodigitoxosídeo), cardenolídeo predominante em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, que tem demonstrado grande potencial como agente antiviral e antitumoral (citotoxicidade) (BERTOL *et al.*, 2011; MUNKERT *et al.*, 2017; XUE *et al.*, 2014; YÜCESAN *et al.*, 2015).

As infecções virais são de fato um potencial alvo dos heterosídeos cardiotônicos, como a causada pelo vírus *Herpes simplex* tipo 1 e 2 (VHS-1 e VHS-2) em humanos (BERTOL *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2008). Entre os 65 cardenolídeos testados contra ambos os vírus, diversos deles se mostraram ativos, mas o maior efeito antiviral observado foi para o GEV, onde essa substância inibiu, em concentrações muito baixas, a replicação do vírus VHS-1 ($0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$, índice de seletividade = 4.566) e VHS-2 ($0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$, índice de seletividade > 6.250). Esse composto também apresentou efeitos antivirais sinérgicos com aciclovir e atividade anti-

Na⁺K⁺ATPase, sugerindo que alterações do gradiente eletroquímico celular podem estar envolvidas no mecanismo de inibição viral (BERTOL *et al.*, 2011).

Portanto este estudo demonstrou que o GEV é um potencial agente antiviral, pois inibiu o vírus VHS-1, aciclovir-resistente e demonstrou possuir um mecanismo antiviral distinto, que pode representar uma nova classe de fármaco antiviral (BERTOL *et al.*, 2011; MUNKERT *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2008).

Adicionalmente à atividade antiviral, foram identificados efeitos citotóxicos promissores no GEV, apresentando IC₅₀ (concentração de um composto necessária, para reduzir o crescimento populacional de organismos, em 50 por cento, *in vitro*) de 0,02 µM em células humanas de adenocarcinoma pulmonar (A549) (XUE *et al.*, 2014). Esses resultados, obtidos por Xue *et al.* (2014), aumentam ainda mais o interesse neste HC, indicando que esse e outros cardenólídeos inibem seletivamente o crescimento celular e se destacam como candidatos a novas pesquisas visando ao desenvolvimento de novos fitofármacos antitumorais.

Algumas pesquisas também comprovaram os efeitos anticancerígenos dos compostos digitálicos. Quatro extratos (metanólico, aquoso, acetato de etila e hexânico), obtidos das folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, foram avaliados quanto à atividade citotóxica contra três linhas celulares de câncer humano, utilizando o ensaio SRB. Todos apresentaram alta citotoxicidade, produzindo valores de IC₅₀ na faixa de 0,78 a 15 µg mL⁻¹, sendo o extrato metanólico o mais ativo em concentrações não tóxicas. Os glicosídeos esteroides (derivados da gitoxigenina) foram detectados nesse extrato metanólico; a gitoxigenina e a gitoxina foram avaliadas no ensaio SRB, usando as três linhas celulares de câncer humano, mostrando valores de IC₅₀ na faixa de 0,13 a 2,8 µM, sendo a linha celular de câncer de adenocarcinoma renal (TK-10) a mais sensível. A avaliação da apoptose morfológica do extrato metanólico e de ambos os compostos na linha celular TK-10 mostrou que sua citotoxicidade foi mediada por um efeito apoptótico (morte celular). Assim os compostos digitálicos são sugeridos em oncologia médica (LÓPEZ-LÁZARO *et al.*, 2003).

Investigações recentes apontou GEV como um agente anticâncer. O GEV apresentou toxicidade reduzida para tipos de células não cancerígenas (MRC-5 de pulmão e PBMC) e ligação de alta afinidade ao Na⁺/K⁺S-ATPase α, avaliada por programa computacional, sendo afirmado o potencial citotóxico de GEV, para a cultura de células, usando ensaios clonogênicos e de formação de esferoides (SCHNEIDER *et al.*, 2018).

Além da atividade antiviral e anticancerígena da *D. mariana* ssp. *heywoodii*, relatos sobre a ação farmacológica do extrato já foram descritos por López-Lázaro *et al.* (2003), sendo também comprovado por Navarro *et al.* (2000) o efeito cardiovascular do extrato metanólico

da planta em animais pela administração via intragástrica. Observaram aumento na contração do átrio de coelhos, efeito diurético em ratos, com ligeiro aumento na excreção de sódio e atividade emética em pombos.

São encontrados ainda poucos relatos de estudos sobre a subespécie *D. mariana* ssp. *heywoodii* na literatura, que pode ser atribuído à sua área geográfica de distribuição muito restrita e à dificuldade de propagação da espécie fora do seu habitat de origem em razão do baixo índice germinativo de suas sementes (NAVARRO *et al.*, 2000).

2.3 Aspectos Agronômicos da espécie

Em relação às características do solo, a espécie *Digitalis purpurea* tem preferência por solos soltos, ácidos, bem drenados, não calcários e adubados, plantio em espaçamentos menos adensados (PROBERT *et al.*, 2007).

Grindeland (2008), ao trabalhar com a espécie *Digitalis purpurea*, obteve melhores cruzamentos de tetraploides, em espaçamentos de plantio menos adensados, e Leuschner (2002), também, observou melhores desenvolvimentos da espécie em plantios de florestas com espaçamentos maiores. Em se tratando da produção de glicosídeos cardiotônicos por *Digitalis*, as condições do solo atuam de forma significativa quando referente à agricultura tradicional (PÉREZ-ALONSO *et al.*, 2009).

A espécie apresenta grande variação no desenvolvimento da população. Suas sementes são consideradas ortodoxas e a germinação é restrita a solo sem vegetação, por isso, frequentemente é encontrada em pastagens (HAY; PROBERT; COOMBER, 1997; NARTOP *et al.*, 2019; SLETVOLD; RYDGREN, 2007). As espécies do gênero *Digitalis* são comumente propagadas por sementes em bandejas, com plantação definitiva, na primavera, em terrenos não calcários, úmidos e sem sombreamentos (MOCHIZUKI, 2014; SILVA, 2012). A colheita deve ser feita em dias secos, durante a tarde, momento em que ocorre maior conteúdo de heterosídeos ativos e, preferencialmente, no segundo ano de vegetação, período em que ocorre o florescimento da planta e quando as folhas acumulam maior teor de constituinte ativo. O processo de secagem deve ser rápido e deve-se utilizar estabilização a 80 °C para a destruição da enzima digipurpuridase (MOCHIZUKI, 2014).

Pesquisas apontam que algumas das ameaças à qualidade da coleta de sementes surgem, durante o período entre a coleta, processamento e armazenamento. Fatores como umidade relativa do ambiente podem influenciar a sua qualidade, logo após sua colheita, sendo mais aconselhável medições de umidade da semente no momento que for realizada e,

subsequentemente, a umidade da semente deve ser constantemente monitorada, para evitar diminuição no seu processo de germinação (HUFNAGEL *et al.*, 2020; PROBERT *et al.*, 2007). Vranckx e Vanderlook (2012), em estudos de germinação de sementes de *Digitalis purpurea*, observaram que, quando germinadas em temperatura e luz controlada, apresentam comportamentos característicos, atingindo altas porcentagens de germinação, quando incubadas em menores temperaturas. O uso de nitrato de potássio (KNO₃), quando aplicado em pequenas dosagens, também, estimulou a germinação das sementes. E essas, quando incubadas na luz, germinam quase 100%. Quando as sementes estão no solo, sua germinação e desenvolvimento até a formação das mudas podem ser mais fáceis, quando desenvolvidas a pleno sol ou após desbaste em florestas, embora também possam ser propagadas em pastagens, em lugares de vegetação moderada à pouca.

Mas deve-se sempre levar em consideração as limitações de cultivo e a quantidade de coletas de sementes, em se tratando das espécies do gênero *Digitalis*, pois essa técnica, quando feita de forma indiscriminada, constitui uma séria ameaça à existência das populações selvagens, podendo afetar sua propagação, especialmente, quando as plantas são colhidas bem antes da maturação das sementes. No entanto a propagação natural de sementes é possível, mas esse método não é eficaz à produção de um número suficiente de plantas, pois as taxas de germinação das sementes são muito baixas (NARTOP, 2019; PAPONE; ALBA; FATTA, 2008; VRANCKX; VANDELOOK, 2012; WURTELE *et al.*, 2012). Também é indicada a sua assepsia para evitar o aparecimento de patógenos (NARTOP, 2019; SHEMATOROVA *et al.*, 2020). Além disso, como o cultivo em condições naturais afeta a produção de metabólitos secundários, por sua dependência das condições edafoclimáticas, estratégias de produção, baseadas em métodos de cultura de tecidos vegetais, têm sido estudadas para melhorar a produção de derivados químicos específicos de grande interesse para a indústria farmacêutica (CACHO *et al.*, 1991; CINGOZ; GUREL, 2016; FATIMA *et al.*, 2009; GUREL *et al.*, 2011; KAIRUZ *et al.*, 2020; KREIS *et al.*, 1990; KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015; KREIS; HENSEL; STUHLEMMER, 1998; MOHAMMED *et al.*, 2015; PATIL *et al.*, 2013; PÉREZ-ALONSO *et al.*, 2009, 2018; PEREZ-BERMUDEZ; CORNEJO; SEGURA, 1983; VERMA *et al.*, 2014, 2016; YÜCESAN *et al.*, 2015).

Embora existam muitos estudos sobre a micropropagação da maioria das espécies do gênero *Digitalis*, ainda não existem estudos agrônômicos em campo para essas espécies, pois essas plantas requerem um período de aproximadamente dois anos, para o desenvolvimento ideal à maximização do acúmulo de substâncias biologicamente ativas (especialmente cardenólidos e seus derivados) nas plântulas. Por esse motivo, esses fatores tornam

extremamente difícil a produção de mudas fitoquimicamente consistentes, abrindo caminho para o estabelecimento de culturas *in vitro* para a melhoria da propagação, preservação e qualidade nas várias espécies de *Digitalis* (VERMA *et al.*, 2016).

Vale lembrar que as espécies medicinais, no que se refere à produção de substâncias com atividade terapêutica, apresentam alta variabilidade (RAVI *et al.*, 2020). A *Digitalis purpurea*, por exemplo, aos quatro meses após o plantio, apresenta 0,0014% de digitoxina (glicosídeo cardioativo), enquanto, aos oito meses, esse teor pode chegar até a 0,08% (cerca de 57 vezes maior do que o anterior) (MARTINS *et al.*, 2009).

Em relação à incidência de doenças na espécie, existem relatos do aparecimento do fungo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (1912), com sintomas visuais de pequenas manchas marrons, circulares nas folhas, expandindo-se para lesões marrons escuras e irregulares cercadas por um halo clorótico. As lesões aumentam progressivamente de diâmetro e cobrem toda a superfície da folha (micélio aéreo com anéis concêntricos de comprimento e 4,2 a 12,5 μm), quando não remediadas a tempo. Testes de patogenicidade foram realizados, e as primeiras lesões de *Alternaria alternata* foram observadas nas folhas, 10 dias após a inoculação à temperatura de 20 a 26°C (GARIBALDI *et al.*, 2019).

Karowe e Golston (2006) sugerem que a espécie é menos susceptível à herbivoria por apresentar em suas folhas a digitoxina, que é uma defesa altamente eficaz contra herbívoros generalistas como as lagartas da traça-cigana (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera: Lymantriidae). Al-Rajhy *et al.* (2003) comprovam o efeito acaricida do extrato de *Digitalis purpurea*. Também foi evidenciado o potencial como planta fitorremediadora (FREITAS; PRASAD; PRATAS, 2004) em que a espécie *Digitalis purpurea* L. (Plantaginaceae) exerce sobre solos contaminados com metais pesados (Ferro (Fe), zinco (Zn) e chumbo (Pb) mecanismos de acumulação. Esses metais podem ser encontrados em suas estruturas, em concentrações metálicas superiores ao nível tóxico, indicam que a espécie também pode conter mecanismos internos de tolerância a metais (MOREIRA *et al.*, 2011; PRATAS *et al.*, 2013, 2014), sendo fitorremediadora também para arsênio (As), antimônio (Sb) e tungstênio (W) (PRATAS *et al.*, 2005).

Pesquisas também evidenciam as propriedades biológicas de *Digitalis purpurea*, cuja digitonina, uma saponina esteroidal, obtida da planta, tem efeito comprovado na desordem sobre as camadas fosfolipídicas, presente na membrana de bactérias, algas, fungos e protozoários, que porventura acometam negativamente a espécie (ORCZYK; WOJCIECHOWSKI; BREZESINSKI, 2017). Vaillant *et al.* (2004) comprovaram a ação no controle biológico de *Digitalis pupurea* e *Digitalis lanata* no tratamento de águas residuais domésticas. Nergi *et al.* (2012) analisaram para a *Digitalis pupurea* e *Digitalis lanata* o

conteúdo mineral (Boro (B), Cromo (Cr), Manganês (Mn), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Cobre (Cu), Arsênico (As) e Chumbo (Pb)), em várias partes da planta em estádios de pré e pós-floração, utilizando espectrometria de massa plasmática indutivamente acoplada (ICP-MS), cultivadas na Índia, relatando que o conteúdo mineral das espécies está dentro da faixa permitida para usos medicinais, recomendando o cultivo da espécie em larga escala. No que tange a estudos de fertilização com espécies do gênero *Digitalis*, Kozera e Majcherczak (2011) avaliaram os teores e as razões molares de macronutrientes, em folhas de *D. lanata*, cultivadas sob diferentes doses de fertilização mineral. No geral, a utilização de diferentes, as proporções de N, P e K induziram um aumento significativo no conteúdo desses nutrientes totais, no entanto reduziu a concentração de sódio (Na), nas folhas, quando comparadas ao controle. Após as fertilizações, as razões K:Ca e K:Na nas folhas foram significativamente aumentadas e a relação Ca:P foi diminuída. Valores altamente significativos foram observados, para a relação K:(Mg+Ca) nas folhas, após aplicação de 80 kg N + 34,96 kg P + 99,6 kg K (214,6 kg NPK, dose intermediária) e 120 kg N + 52,44 kg P + 149,4 kg K (321,8 kg NPK, maior dose). A relação Ca:Mg foi claramente diminuída, em comparação ao controle, após o uso da menor dose avaliada (40 kg N + 17,48 kg P + 49,8 kg K = 107,3 kg NPK).

E, de acordo com Heeger (1956), a quantidade de NPK recomendada para *D. purpurea* é de 60 kg N. ha⁻¹, 60 kg P₂O₅ ha⁻¹ e 80 kg K₂O ha⁻¹. Silva (2017), realizando análise química do adubo utilizado no estudo demonstrou uma quantidade de 21 g N kg⁻¹, 20 g P₂O₅ kg⁻¹ e 7,3 g K₂O kg⁻¹, que, para atender a necessidade recomendada, necessitaria, para cada vaso, uma quantidade de esterco de galinha de 0,286; 0,3 e 1,10 kg m², respectivamente. Assim, verificou-se que a espécie *D. mariana* ssp. *heywoodii* precisa de uma quantidade superior que a recomendada para se obter uma máxima produção.

Algumas pesquisas relacionadas às flores da espécie também foram descritas, por sua simetria bilateral (PRESTON; MARTINEZ; HILEMAN, 2011). A aplicação de ácido giberélico favorece o crescimento e melhor formação das flores e caule, o tempo de desenvolvimento das flores em vasos (CLARK *et al.*, 2010), a taxa de ataque por herbívoros florais (SLETVOLD; GRINDELAND, 2008), a ecologia reprodutiva (NAZIR; RESHI; WAFI, 2008), a estratégia para floração (SLETVOLD; GRINDELAND, 2008), investigação do nectário floral (GAFFAL; FRIEDRICH; EL-GAMMAL, 2007; GAFFAL; HEIMLER; EL-GAMMAL, 1998), taxa de visitação floral (GRINDELAND; SLETVOLD; IMS, 2005), manejo pós-colheita (REDMAN *et al.*, 2002), estrutura e composição florística (NEUHÄUSLOVÁ; HÄRTEL, 2001).

A análise de produtividade, levando em conta parâmetros como a condutância da folha, taxa de transpiração, absorção de nutrientes e anatomia foliar, também, foram avaliados, exemplificando o seu desenvolvimento em ambientes protegidos (LEUSCHNER, 2002). Além disso, também foram realizadas medições biométricas (BRUELHEIDE; HEINEMEYER, 2002; ROTHE *et al.*, 1999; STAATS; HILLOCK; KLETT, 1998; WILLIS; MEMMOTT; FORRESTER, 2000) e avaliações de sintomas fitotóxicos (JANSEN; SCHUPHAN; SCHMIDT, 2000).

O comportamento agrônômico, formas de cultivo, tipos diferentes de adubação, comportamento de crescimento, em diferentes tipos de solos, formas de rega e pragas e doenças mais encontradas na espécie ainda são pouco investigados do ponto de vista técnico.

2.4 Omissão de nutrientes

A adubação nutricional é fundamental à formação de todas as espécies. Além de ser essencial para o seu crescimento, promove efeitos posteriores à melhora da produtividade, da qualidade e do estabelecimento de qualquer cultura. Para isso, o conhecimento das exigências nutricionais das espécies, de um modo geral, faz-se necessário (FEITOSA *et al.*, 2011; HUSSAIN *et al.*, 2020).

A adubação inadequada facilita o ataque de pragas, promove o aparecimento de plantas com crescimento limitado, menor incremento médio anual, redução na taxa de desenvolvimento da espécie, conseqüentemente, em sua qualidade (ASENSIO *et al.*, 2020). Tian *et al.* (2020) sugerem que é necessário adicionar nutrientes ao solo conforme as exigências da planta. A determinação de doses adequadas e o seu relacionamento com as respostas da planta aperfeiçoam a recomendação das quantidades de nutrientes essenciais a serem aplicadas.

Um nutriente pode ser considerado essencial, quando sua ausência impede que a planta complete o seu ciclo de vida, não podendo ser substituído por outro elemento com propriedades similares e ter participação direta no metabolismo da planta, sem o qual ela não pode sobreviver. Os nutrientes requeridos, em maiores concentrações pelas plantas, são os macronutrientes, que são: N, P, K, Ca, Mg, S, C, O e H. Os nutrientes que são requeridos em menores quantidades pelas plantas são os micronutrientes sendo eles: Cl, Mn, B, Zn, F, Cu, Ni e Mo (MALAVOLTA, 2006).

Os nutrientes têm funções essenciais e específicas no metabolismo das plantas. Dessa forma, quando um dos elementos essenciais não está presente em quantidades satisfatórias, ou em condições que o tornam pouco disponível, a sua deficiência nas células promove alterações

no metabolismo. Os sintomas de carências minerais são mais ou menos característicos, para cada nutriente, dependendo também da severidade, da espécie/cultivar e de fatores ambientais (SARKER; OBA, 2020).

A diagnose visual de deficiências minerais em plantas, juntamente com o conhecimento dos teores de nutrientes, pode constituir uma técnica que vai auxiliar na avaliação da necessidade de fertilizantes e corretivos para a espécie em questão. A desordem nutricional, quer seja por deficiências ou excessos dos nutrientes minerais, causa diminuição na produção de qualquer espécie. Para estudos dessa natureza, pode-se utilizar a técnica do cultivo de plantas em solução nutritiva, pois ela permite controlar mais adequadamente a composição do meio e eliminar a heterogeneidade e complexidade comuns nos cultivos em solo (COLE *et al.*, 2020).

A avaliação de exigências nutricionais de plantas pode envolver aspectos qualitativos ou quantitativos. Na avaliação qualitativa, utiliza-se, comumente, técnicas como a do elemento faltante ou omissão de nutrientes. Essas técnicas fornecem informações sobre quais nutrientes deficientes fazem efeito no desenvolvimento da planta, qual a importância relativa dessa deficiência; qual a velocidade de redução da fertilidade do solo, entre outros (CARLOS *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2019).

Na literatura há poucas informações sobre a fertilização química e exigências nutricionais de plantas medicinais, principalmente, sobre quais elementos limitam o crescimento e como os nutrientes afetam a boa produtividade e a produção dos metabólitos secundários (ALVARENGA, 2013; SANTOS *et al.*, 2010). Muitas vezes o emprego de adubos químicos, dentro dos limites técnicos, altera o teor dos princípios ativos das plantas. O aumento de biomassa pode compensar uma redução do teor de fitofármacos, mas depende da análise técnica, que deve ser feita em cada situação (NUNES *et al.*, 2019).

A produção de metabólitos secundários e a qualidade de princípios ativos também estão associadas com a resposta da interação da planta com o ambiente e pode ser desencadeada em condições de estresse (FREITAS; MONNERAT; VIEIRA, 2008; MARTINS *et al.*, 2000). A nutrição mineral é um dos fatores mais importantes que causam esse estresse e interfere diretamente no crescimento vegetativo e na produção de metabólitos secundários e óleos essenciais (BIASI *et al.*, 2009; MATTOS, 1989).

Como exemplo, uma pequena quantidade de Cu, Zn, Fe e Mn controla a maior parte das atividades fisiológicas, por meio da redução do nível do teor de clorofila nas folhas, influenciando a capacidade fotossintética e afetando o crescimento da planta (YADEGARI; SHAKERIAN, 2014).

No entanto, para determinar se esses limites técnicos são de importância na adubação química de plantas e conhecer qual a dosagem correta a ser aplicada, umas das técnicas que pode facilitar nesse processo é a da omissão de nutrientes, em que há um tratamento chamado *completo*, no qual as plantas recebem todos os macros e micronutrientes e nos demais tratamentos, os macro e micro nutrientes são omitidos, um de cada vez (CAIONE; LANGE; SCHONINGER, 2012).

Existem atualmente várias soluções nutritivas que podem ser utilizadas como padrão, todas propostas em pesquisas de nutrição mineral, sendo uma grande diferença encontrada no que se refere aos macronutrientes. Mas grande parte das formulações existentes são modificações da solução original de Hoagland e Arnon (1950), desenvolvida a partir das exigências nutricionais do tomateiro. Portanto essa solução é a mais usada na investigação de problemas nutricionais de plantas, servindo também como parâmetro de pesquisas voltadas a entender o efeito de cada nutriente na planta quando aplicando a submissão de cada elemento químico específico (VAN DELDEN; NAZARIDELJOU; MARCELIS, 2020).

Segundo Hoagland e Arnon (1950), não há uma composição nutritiva melhor que outra, pois as plantas possuem grande capacidade de adaptação às diferentes condições nutricionais. Nos primeiros estudos, a composição química das soluções nutritivas simulava a constituição da solução do solo; atualmente, a composição de uma solução nutritiva baseia-se, preferencialmente, na composição química das folhas por serem os órgãos que melhor refletem o estado nutricional da planta. Segundo Silva *et al.* (2018), as maiores diferenças entre esses dois tipos de solução residem nos teores de N, P e K, com concentrações mais elevadas nas que se baseiam na composição química foliar.

A solução nutritiva padrão de Hoagland apresenta uma fórmula proposta, em 1950, por Hoagland e Arnon, cujos valores são expressos em (mg L⁻¹) são: N-N₀₃ (210), P (31), K (234), Ca (160), Mg (48), S (64), B (0,5), Cu (0,02), Fe (1,0), Mn (0,5), Mo (0,01) e Zn (0,05). Existe outra versão dessa solução com a adição de N-NH₄(14), mantendo-se o N total constante. Essa solução tem sido a mais usada em pesquisa com nutrição mineral de plantas e constitui-se a base para a formulação de inúmeras soluções nutritivas comerciais existentes em todo o mundo (COLE *et al.*, 2020; GONDIM *et al.*, 2010). Além disso, a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) é considerada a mais completa, a qual disponibiliza todos os nutrientes, para o crescimento das plantas, sem causar sintomas de toxidez ou estresse salino. Existem diversas adaptações dessa solução, as quais são adequadas a cada cultura em estudo (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Janpen *et al.* (2019), com o objetivo de determinar padrões de crescimento e deficiência, bem como potenciais antioxidantes de hortelã japonesa (*Mentha arvenses* L., Lamiaceae), cultivados hidroponicamente sob macronutrientes e micronutrientes limitados, ao cultivarem a espécie, em solução nutritiva composta por solução completa de Hoagland e soluções nutricionais, sem um dos seguintes macronutrientes e micronutrientes: nitrogênio (-N), fósforo (-P), potássio (-K), ferro (-Fe), manganês (-Mn) e cobre (-Cu), observaram que, sob condições de estresse de nutrientes, a planta apenas deu respostas antioxidativas às deficiências de fósforo e potássio.

Para *Cymbopogon flexuosus* em omissão de macronutrientes N, P, K, Ca, Mg e S, pela técnica do elemento faltante na avaliação do crescimento, diagnóstico visual, teor e composição química do óleo essencial de *C. flexuosus* em cultivo hidropônico, após 90 dias de cultivo, biomassa seca das raízes e da parte aérea, relação raiz-parte aérea, número de perfilhos, análise foliar, teor, produtividade e composição química do óleo essencial foram avaliados. Lopes *et al.* (2019) observaram que a supressão de macronutrientes, em uma cultura hidropônica, influenciou o crescimento e a composição química do óleo essencial de *C. flexuosus*. A produção total de biomassa foi mais limitada na omissão de (P) potássio e (Mg) magnésio. A supressão do (S) enxofre promoveu aumento no teor e rendimento de óleo essencial. O maior teor de citral foi observado na omissão de (P) fósforo e (N) nitrogênio. A supressão do (S) enxofre promoveu aumento no teor e rendimento do óleo essencial. O maior teor de citral foi observado na omissão de (P) fósforo e (N) nitrogênio. A supressão do (S) enxofre promoveu aumento no teor e rendimento de óleo essencial. O maior teor de citral foi observado na omissão de (P) fósforo e (N) nitrogênio. Conclui-se que o (P) potássio e o (Mg) magnésio são os macronutrientes mais limitantes, para a produção de biomassa, com a ordem limitante de $K = Mg > N = Ca = P > S$.

Lippia gracilis Schauer (Verbenaceae) Almeida *et al.* (2018) estudaram o efeito da omissão de macronutrientes no crescimento e na composição química volátil com a técnica do elemento faltante e solução nutritiva completa (HOAGLAND; ARNON, 1950) e soluções com omissão de macronutrientes para a deficiência de N, P, K, Ca, Mg, e S. Nesse estudo, foi observado que os macronutrientes influenciaram significativamente no crescimento e na composição química volátil. Além disso, o peso seco das folhas diminuiu em ordem de importância dos macronutrientes da seguinte forma: $Ca = K = N > P > Mg > S$ e a quantidade e composição dos compostos voláteis variaram de acordo com a omissão de macronutrientes. Os principais constituintes foram caracterizados por p-cimeno (variando de não detectado a 43,41%), timol (3,86% a 7,95%), carvacrol (44,09% a 76,69%) e cariofileno (0,52% a 6,00%),

o conteúdo de que eram dependentes do macronutriente omitido. A falta de Ca, Mg e S aumentou o conteúdo de cimenó e diminuiu o timol e o carvacrol em comparação ao controle. A solução completa e a omissão de N, P e K mantiveram o mesmo teor de timol e carvacrol. Assim, os autores concluíram que a disponibilidade de macronutrientes controlou efetivamente o crescimento das plantas e a composição química volátil de *L. gracilis* (ALMEIDA *et al.*, 2018).

Alvarenga *et al.* (2015), em estudos com a solução de Hoagland, aplicando a técnica do elemento faltante sobre os efeitos no crescimento, teor de óleo essencial e composição da fração volátil de *Achillea millefolium* L. (Compositae), cultivada em sistemas hidropônicos deficientes em macro e micronutrientes, observaram que a composição da solução nutritiva exerceu um efeito significativo, em todos os parâmetros de crescimento (número de folhas; diâmetro do caule; tamanho da raiz; parte aérea; raiz; matéria seca total), embora os sintomas visuais de deficiência de nutrientes tenham sido mais marcados após a omissão dos macro nutrientes em comparação com os micronutrientes.

Valeri, Pizzaia e Cruz (2014), também, comprovaram que a solução nutritiva exerceu efeito nos parâmetros de crescimento em *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae) “pau-brasil”, decorrentes da omissão de nutrientes pela técnica do elemento faltante. Ao avaliar sintomas visuais de deficiência nutricional, altura, diâmetro do caule, matéria seca da parte aérea das plantas, incluindo caule, ramos e folhas e teor dos nutrientes nas folhas, concluíram que a omissão de nitrogênio em neossolo quartzarênico limitou o crescimento em altura e a produção de biomassa da parte aérea das plantas de pau-brasil. Sendo os primeiros sintomas de deficiência nutricionais decorrentes da omissão de N, em seguida, apareceram os sintomas de P, Ca, Mg, S, Cu e Mn e, mais tardiamente, os sintomas da deficiência de K e B.

Para a *Achillea collina* Lam. (Asteraceae), foram avaliadas a omissão de nitrogênio e a produção de compostos fenólicos, sendo observado maior teor desses compostos no tratamento com a omissão desse elemento e a mesma resposta foi observada para camomila (*Matricaria chamomilla* L., Asteraceae) para a produção de cumarinas (GIORGI *et al.*, 2009; KOVÁČIK; KLEJDUS, 2014). Os teores de K influenciam na produção de metabólitos secundários. Em estudos feitos por Garlet *et al.* (2007) encontraram-se maiores teores de óleo essencial em espécies de menta (*Mentha arvensis* e *Mentha gracilis* e *Mentha piperita* var. *citrata*) com o aumento da concentração de K na solução nutritiva. Entretanto a deficiência em K, no maracujeiro doce, proporcionou aumento do princípio ativo vitexina (FREITAS; MONNERAT; VIEIRA, 2008).

Em menta (*Mentha piperita* L., Lamiaceae), cultivada em solução nutritiva, a proporção ideal de P e N foi a de 60 mg L⁻¹ de P e 4 mg L⁻¹ de N, sendo observada a diminuição gradual no rendimento de óleo essencial, ao longo do período de cultivo, além de uma relação inversa entre o aumento da matéria seca e o teor de óleo essencial (SOUZA *et al.*, 2007). Araújo (2007) avaliou a nutrição mineral em erva-baleeira (*Cordia verbenaceae* DC.) (Boraginaceae) e observou que o incremento de P e N na solução nutritiva aumentou o rendimento de óleo, mas, para o fósforo, houve diferença significativa para os teores de α -humuleno.

Em insulina-vegetal (*Cissus sicyoides* (L.), Nicolson & C.E. Jarvis, Vitaceae) verificaram que a produção de mucilagem respondeu positivamente às doses de N, sendo a melhor interação observada para a menor dosagem de fósforo avaliada (ABREU *et al.*, 2002; CUZZUOL *et al.*, 2008).

Em relação a pesquisas com as espécies do gênero *Digitalis*, alguns estudos focaram na relação entre características do solo, nutrientes das plantas e produção de cardenólídeos. Observaram-se que o conteúdo de cardenólídeo em *Digitalis* é inversamente proporcional à relação de N, P, K e Cu no solo, enquanto o teor de Fe e Mg das folhas jovens é positivamente correlacionado com as concentrações de cardenólídeos (LUCKNER; WICHTL, 2000). Nas décadas de 1970 e 1980, a seleção de plantas com alta resistência a infecções por septoriose em *Digitalis* produziu uma variedade que não precisou ser pulverizada com fungicidas e também mostrou um aumento de 50% na produção de digoxina. Uma questão levantada por pesquisadores foi que talvez esse aumento de digoxina pudesse estar também relacionado com a adubação (ARDELEAN; COSTEA; CORDEA, 2006; LICHIOUS; MELZHEIMER; WICHTL, 1992; LUCKNER; WICHTL, 2000).

Em *Digitalis lanata*, Tsao, Gomez e Chaubal (1961) observaram que o aumento na concentração da dose de K, pela adubação mineral, diminuiu a quantidade de cardenólídeos.

Conteúdos de cardenólídeo em *Digitalis obscura* foram negativamente correlacionados com adubações no solo de nitrogênio, fósforo e potássio e cobre, enquanto o conteúdo de ferro e magnésio das folhas jovens foi positivamente correlacionado com as concentrações de cardenólídeo (ROCA-PÉREZ *et al.*, 2005).

E, para *Digitalis thapsi*, foram investigadas em cultura de tecido o maior crescimento de plântulas e produção de cardenólídeo em presença de luz e nutrição com cálcio (Ca) (CACHO *et al.*, 1999).

Pérez-Alonso *et al.* (2009) afirmam que a produção de glicosídeos cardiotônicos nas espécies de *Digitalis* podem sofrer várias limitações no seu cultivo convencional e grandes influências pela adubação e condições de solo.

Assim, cada espécie apresenta necessidades específicas dos nutrientes, que variam, de acordo com o crescimento e o metabolismo do princípio ativo produzido, não sendo encontrado na literatura experimento de omissão de nutrientes para a espécie *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.

2.5 Cultivo em malhas coloridas

Considerado um novo conceito agrotecnológico em cultivo protegido, a introdução de malhas coloridas permite combinar a proteção física com a filtragem da radiação solar, para promover respostas fisiológicas reguladas pela luz, que afetam as plantas por diversos fatores ambientais, genéticos, edafoclimáticos, entre outros, visto que, entre os fatores ambientais, a qualidade e quantidade de luz afetam consideravelmente o crescimento e o desenvolvimento do vegetal (BRANDÃO FILHO *et al.*, 2018).

Assumindo um dos papéis mais importantes no desenvolvimento do vegetal, a luz é considerada fonte de energia para os organismos fotossintéticos, os quais possuem estruturas minuciosamente desenvolvidas para absorvê-la de forma eficiente. Assim, a qualidade da luz incidente interfere, direta ou indiretamente, no funcionamento do aparelho fotossintético, fazendo com que ele necessite se adaptar à luz predominante de um determinado ambiente, processo conhecido como aclimação fotossintética à luz (KERBAUY, 2019).

A aclimação fotossintética é regulada por alguns processos do desenvolvimento vegetal levando as espécies à capacidade de se adaptar a diferentes condições luminosas. Por meio de seus fotorreceptores, as plantas podem captar as variações na quantidade e qualidade de luz, adaptando seu desenvolvimento às condições a que são expostas (SILVA, 2019).

Para a energia luminosa ser utilizada pelos sistemas vivos, é necessário que ela seja absorvida e a substância que absorve a luz seja denominada pigmento. Alguns pigmentos absorvem todos os comprimentos de onda da luz, mas, em sua maioria, somente um determinado comprimento de onda é absorvido e transmite ou reflete os comprimentos de onda que não são absorvidos. Esse padrão de absorção da luz é conhecido como espectro de absorção (TAIZ *et al.*, 2017).

As plantas desenvolveram uma série de fotorreceptores que regulam seu crescimento e desenvolvimento, em relação à presença, quantidade, qualidade, direção e duração da radiação luminosa incidente, para aperfeiçoar a captação de energia proveniente da luz para a fotossíntese (MORINI; MULEO, 2003). Esses fotorreceptores são múltiplos e possuem

diversos alcances espectrais que são capazes de absorver comprimentos de onda na região do ultravioleta, azul, vermelho e vermelho-distante (KERBAUY, 2019).

A radiação é percebida pelo fitocromo o qual ativa determinados genes que conduzem o desenvolvimento e a diferenciação. O fitocromo é um pigmento proteico que absorve luz mais fortemente nas regiões do vermelho (650-680nm) e vermelho-distante (710-740nm), mas também absorve luz azul. Esse pigmento detecta a relação entre a luz vermelha e vermelho-distante, que codifica em sinal celular a excitação causada pela luz, alterando o metabolismo celular e influenciando no desenvolvimento das plantas (CENTOFANTE, 2020).

Todo esse aparato fotossintético é capaz de afetar a taxa de crescimento celular do vegetal, por meio da fotoestimulação da biossíntese de substâncias, do fototropismo, da fotomorfogênese ou do fotoperiodismo, interferindo no acúmulo e composição de pigmentação, na diferenciação dos plastídeos e em outras alterações fisiológicas dependentes de luz (SILVEIRA, 2019).

Para auxiliar as espécies na recepção de luz, existem as malhas de telas coloridas que são produzidas com aditivos especiais, para manipular o espectro de luz solar, tornando a qualidade da luz incidente sobre a cultura mais benéfica, pelo fato da malha converter parte da luz direta em luz difusa e pela capacidade de espalhar a luz que passa diretamente por elas. A atenuação da radiação pelas malhas é importante, já que afeta os componentes do balanço energético, assim como fluxos de calor sensível e latente, além da condição hídrica das plantas, de acordo com suas propriedades físicas (SILVA, 2019).

A radiação solar apresenta um espectro contínuo de comprimentos de onda (λ), que, segundo Pereira (2007), do ponto de vista agrônomo, pode ser condensado em três faixas principais, que englobam as radiações: ultravioleta, com $\lambda < 400$ nm, de alto poder biocida; visível, com $400 \text{ nm} < \lambda < 700$ nm, também denominada radiação fotossinteticamente ativa (RFA), por seu poder fotossintetizante; e a infravermelho próximo (IVP), com $700 \text{ nm} < \lambda < 3000$ nm, a qual é utilizada nos processos morfogênicos das plantas. A radiação de ondas curtas, ao interagir com atmosfera e a superfície, sofre processos de atenuação (absorção, difusão e reflexão). Logo apenas uma parte do que chega ao topo da atmosfera atinge a superfície.

Henrique *et al.* (2011) afirmaram que, segundo o fabricante, as telas confeccionadas com filme de polietileno de alta densidade e fios de monofilamento são resistentes à radiação ultravioleta e, em consequência da refração da luz direta pela estrutura de cristais, alteram o espectro da luz que as atravessa, reduzindo ou aumentando os picos de transmitância de radiação de determinados comprimentos de onda. Além disso, em razão do entrelaçamento dos fios, essas telas aumentam a porcentagem de luz difusa, o que gera maior cobertura luminosa

sobre as plantas, principalmente sobre as folhas inferiores. Observa-se que a dependência da luz no desenvolvimento das plantas é complexa, envolvendo a ação combinada de vários sistemas fotoreceptores, entre os quais, receptores para a detecção de luz vermelha, azul e ultravioleta (KERBAUY, 2019). Existem, no mercado, malhas de variadas cores: branca, preta, azul, vermelha, cinza, verde e pérola, utilizadas no cultivo de árvores frutíferas, hortaliças, plantas ornamentais e grandes culturas (BRANDÃO FILHO *et al.*, 2018).

As malhas de cor azul proporcionam luz do espectro em comprimento de onda de 400-540 nm, permitindo a passagem de ondas com transmitância na região do azul-verde, intensificando o fototropismo e a fotossíntese, atuando no crescimento, desenvolvimento e aclimação das plantas às condições ambientais (TAIZ *et al.*, 2017).

Telas de coloração vermelha transferem a luz do espectro nas ondas vermelho e vermelho distante, com transmitância para comprimentos de ondas superiores a 590 nm, o que reduz as ondas azuis, verdes e amarelas, difundindo-a por meio da malha, atenuando o desenvolvimento da estrutura fotossintética das plantas, o que pode aumentar o acúmulo de amido em algumas espécies, pela inibição da translocação de assimilados para fora das folhas (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

É considerada neutra a malha preta que auxilia apenas na redução da incidência de radiação sobre as plantas, sem influência na qualidade espectral da luz (OREN-SHAMIR *et al.*, 2001). As telas são projetadas, especificamente, para modificar a radiação incidente em termos de espectro e dispersão (ELAD *et al.*, 2007). Conforme a cor da tela, é possível modificar os padrões de crescimento das culturas (MACEDO *et al.*, 2011) e gerar mudanças em várias características anatômicas, fisiológicas, morfológicas e bioquímicas das plantas (BRANT *et al.*, 2009).

Em busca dessas mudanças nas características das plantas e no seu melhor desempenho em cultivo, podemos exemplificar espécies medicinais que se desenvolveram sob telas de cor azul, vermelha e preta. A espécie *Melissa officinalis* L. (melissa) obteve maior crescimento sob elas, quando comparado ao cultivo a pleno sol. Além disso, o uso da malha vermelha proporcionou o maior teor de citral (BRANT *et al.*, 2009). A espécie *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), conhecida como alfavaca-cravo, apresentou vantagens, em relação à maior área foliar total, mantida sob tela azul e vermelha (MARTINS *et al.*, 2008, 2009). Para o cafeeiro (*Coffea arabica* L., Rubiaceae), a tela vermelha foi a mais eficiente, ao promover o crescimento em altura, área foliar, massa de matéria seca foliar e massa de matéria seca total (HENRIQUE *et al.*, 2011). Alves *et al.* (2018), trabalhando com *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.

Wilson (erva-cidreira, Verbenaceae), observaram maior biomassa de folhas secas (4,83 g por planta) nas plantas sob cultivo sob tela azul.

Em plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Compositae), os resultados revelaram que a malha azul proporcionou aumento no acúmulo de massa seca total e maior crescimento em altura. Além disso, houve aumento nos teores de clorofilas *a*, *b* e total, para ambas as espécies, em relação às outras malhas e ao tratamento a pleno sol, além das plantas sob malhas vermelha e azul apresentaram maior alocação de matéria seca para as raízes. O teor de óleo essencial das plantas crescidas sob malha azul foi de 0,14%, o que correspondeu a um acréscimo de 142% em relação ao teor verificado nas plantas crescidas a pleno sol (SOUZA *et al.*, 2010, 2011).

Para *Melissa officinalis* L., o uso da tela azul resultou em incrementos de 116% na altura da planta, 168% em área foliar, 42% em teor de clorofila e 30% em rendimento de óleo essencial na espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Em *Piper hispidinervum* C. DC., (Piperaceae), as telas azul e vermelha estimularam o maior crescimento em altura e a melhor produção de pigmentos fotossintéticos (LIMA *et al.*, 2017). *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) cultivados sob malha azul produziram maior biomassa seca de folhas e maiores teores e rendimentos do óleo essencial (SOUZA *et al.*, 2014). Já para *Mentha piperita*, as telas coloridas geraram acréscimo no acúmulo de biomassa seca da parte aérea e da raiz e aumento nos teores de clorofila *a* e *b* (SOUZA *et al.*, 2012). Nascimento *et al.* (2014) observaram que *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae), cultivadas sob malhas coloridas, quando comparadas com o pleno sol, apresentaram diferenças quanto à densidade estomática, aos diâmetros das cavidades secretoras e à biomassa seca. Já Silva *et al.* (2014), para *Tamarindus indica* L. (Fabaceae), apresentou maiores densidades estomáticas sob malhas azul e vermelha. Estudos com *Plectranthus neochilus* Schltr (Lamiaceae), os autores verificaram que o crescimento e o desenvolvimento da espécie (produção de biomassa seca da planta, relação raiz/parte aérea, área foliar total, área foliar específica, razão de área foliar e razão de peso foliar) foi influenciado pela qualidade e quantidade de luz, mais marcadamente pela luz azul (ROSAL *et al.*, 2008). E, para *Origanum vulgare* L., (orégano, Lamiaceae), a malha vermelha proporcionou maior teor dos compostos hidrato de cis-sabineno e hidrato de trans-sabineno e a tela preta maior teor de timol (CORRÊA *et al.*, 2012).

Em se tratando da ação da luz sobre *Digitalis purpurea*, é comprovada a influência de suas diferentes qualidades na espécie sob ambientes controlados (VERMA *et al.*, 2018). Como exemplo, podemos citar Yin e Johnson (2000), que descrevem um estudo sobre o potencial de plantas como *Arabidopsis thaliana* L. Heynh., (Brassicaceae), *Digitalis purpurea* L. e *Silene*

dioica L.) Clairv. (Caryophyllaceae) de se adaptarem a ambientes com flutuação de luminosidades e períodos de tempo entre 15 min e 3 h. As espécies foram cultivadas a uma irradiância de 100 μmol . Após 4 a 6 semanas, foram transferidas para luz em regimes que flutuaram entre 100 e 475 ou 810 μmol .

Concluindo, as plantas, na maioria dos casos, são capazes de sofrer aclimatação sob tais condições, aumentando sua taxa fotossintética máxima, com mudanças na proteína Rubisco e no conteúdo de citocromo *f*, com alterações marginais no conteúdo e composição dos pigmentos fotossintéticos. Portanto a qualidade da luz age de forma significativa no desenvolvimento das espécies *A. thaliana*, *D. purpureae* e *S. dioica*.

Avaliando ainda a sensibilidade de *D. purpurea* a efeitos de luz, Murchie e Horton (1998), ao estudarem quatro espécies de plantas (*Digitalis purpurea*, *Chamerion angustifolium* (L.) Holub (Onagraceae), *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) P. Beauv. (Poaceae) e *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae), cultivadas sob baixa radiância com um espectro do tipo sombra, luz branca moderadamente alta e luz branca intermediária, observaram que as taxas de clorofila a/b foram sensíveis à qualidade e quantidade de luz em *C. angustifolium*, em *D. purpurea* sob luz branca moderada/alta, taxas menores foram encontradas em baixa irradiância e intermediária, enquanto as outras espécies não apresentaram resposta, sugerindo estudos mais aprofundados em diferentes cores de luz.

Luckner e Wichtl (2000) resumiram estudos que mostraram os teores de cardenolídeo nas espécies digitais que estão ligadas às variações de intensidade de luz, fotoperíodo e o termoperíodo. Uma correlação positiva entre a intensidade e qualidade de luz e cardenolídeos também foi observada, mas a atuação dos cloroplastos pode interferir nesse processo de formação (HAGIMORI; MATSUMOTO; OBI, 1982; LUCKNER; WICHTL, 2000).

No cultivo de plantas medicinais, é sempre importante associar a produção de biomassa aos processos de formação da espécie e à qualidade da planta enquanto matéria-prima, para a fabricação de medicamentos fitoterápicos. Desta forma, como em qualquer outra cultura, é preciso almejar uma produtividade ótima, não só de biomassa, mas dos teores de princípios ativos, o que pode ser corroborado por meio do estudo da interferência de fatores que influenciam esses caracteres, como a disponibilidade de nutrientes e a intensidade luminosa (CHOUDHARY *et al.*, 2020).

E, quando o cultivo visa à produção de plantas medicinais e aromáticas, o estudo da influência da luz torna-se indispensável, visto que a radiação é capaz de promover alterações no metabolismo primário e secundário dessas espécies, além de modificações na morfologia vegetal.

2.6 Validação de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A busca por metodologias analíticas que sejam confiáveis, comparáveis e reproduzíveis em ampla escala tem sido alvo de pesquisas constantes nos ramos da química qualitativa e quantitativa (CHELLINI *et al.*, 2015). Para que uma metodologia analítica de identificação ou mesmo quantificação seja difundida, como parâmetro de determinação, para qualidade e certeza de resultados, ela deve passar por um sistema de testes e verificações denominado validação (SWARTZ; KRULL, 2018).

A validação de um método analítico é o processo que demonstra que um procedimento analítico é adequado para o seu fim, ou seja, utilizado para confirmar que o procedimento empregado, para a análise de uma substância de interesse, apresenta qualidade, confiabilidade e resultados consistentes. Esse entendimento é obtido a partir de estudos cientificamente baseados em métodos de desenvolvimento e otimização (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2014).

Os métodos de desenvolvimento precisam ser validados ou revalidados (PATIL; AHIRRAO; PAWAR, 2017). A revalidação é necessária, quando o escopo do método validado foi alterado, por exemplo, se as condições operacionais mudaram (PATEL; PATEL; GAJRA, 2011). A aprovação de produtos pelas autoridades regulamentadoras exige que o solicitante prove o controle de todo o processo de desenvolvimento. A validação do método resulta em métodos oficiais de testes e controle de qualidade. A aprovação de produtos pelas autoridades regulamentadoras exige que o solicitante prove o controle de todo o processo de desenvolvimento. A validação do método resulta em métodos oficiais de testes e controle de qualidade (RAVISANKAR *et al.*, 2015).

Para orientar a validação, os órgãos ou agências responsáveis elaboram diretrizes que devem ser seguidas pelos laboratórios e analistas quando na execução de metodologias próprias de uso analítico (COELHO *et al.*, 2018). Tais diretrizes, previamente estudadas e exaustivamente verificadas, quando adotadas pelos laboratórios, fornecem aos órgãos a garantia de que os dados por eles produzidos são corroborados pelas próprias técnicas propostas e que carregam a confiabilidade da certificação estabelecida (NOVAES *et al.*, 2017).

Os processos de validação se subdividem em duas classes principais, uma determinada de validação no laboratório, que consiste em técnicas de apuração da metodologia, levando-se em consideração os inúmeros dados coletados no mesmo laboratório, com mesmo equipamento, analistas e condições repetidas do meio (CANDIOTI *et al.*, 2014). A segunda classe, chamada

validação completa, consiste na verificação do método, em diferentes laboratórios, que integram uma rede análoga de determinação, na qual o método de verificação será o mesmo, mas as condições laboratoriais, analistas e equipamentos serão diferentes (BENEVIDES *et al.*, 2014).

Validar um método é um procedimento demorado, que requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos. No intuito de padronizar os procedimentos, a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 2018) publicou um guia para calibração em Química Analítica. As agências regulamentadoras dos Estados Unidos ("FDA, *Food and Drug Agency*"), Japão (MHLW, "*Ministry of Health, Labour and Welfare*") e União Europeia (EMA, "*European Medicine Agency*") passaram a organizar a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, "*International Conference on Harmonisation*"), para estabelecer padrões para os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos.

Por intermédio da ICH, representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos (RIBANI *et al.*, 2004). A norma Q2 (R1), "*Validation of analytical procedures: text and methodology*", da ICH recomenda utilizar, para o processo de validação, os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez (ICH, 1996).

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a diretriz de validação de métodos analíticos (DAE), dada pela Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017), que recomenda os mesmos parâmetros, cujas análises são requeridas pelas autoridades de saúde brasileiras para o registro de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2003). Essa resolução é aplicável a métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos, em todas as suas fases de produção (BRASIL, 2017) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) a orientação fica a cargo do documento DOQ-CGCRE-008 de 05 de agosto de 2016 atualizado em julho de 2018 (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2018).

Pelas disposições vigentes, o processo de validação passa por uma série de ensaios que incluem, entre outros, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), seletividade, repetitividade, reprodutibilidade, robustez e outros parâmetros estatísticos de análise descritiva (BRASIL, 2017; INMETRO, 2018).

A linearidade busca identificar um comportamento diretamente proporcional entre a variável medida e uma resposta dentro de um intervalo determinado (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002), geralmente, desconhecido antes do teste. O comportamento pode ser verificado empiricamente pela obtenção de uma curva analítica, em que os dados obtidos são levados à regressão linear, resultando em um equacionamento descritivo do comportamento observado (DURAND; LECOMTE; VILLENEUVE, 2016).

A regressão linear é bem-posta, quando o seu coeficiente de correlação, r , aproxima-se do valor unitário. A ANVISA recomenda valores de r superiores a 0,99, enquanto o INMETRO superiores a 0,90 (BRASIL, 2017; INMETRO, 2018). Outros parâmetros constituem ponto de relevante interesse, para a análise de linearidade como o desvio-padrão e o desvio-padrão residual (DPR) dos dados coletados (NOVAES *et al.*, 2017).

O parâmetro LD indica o menor valor de uma variável (concentração) que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado para os limites de exatidão e precisão exigidos pelo método (SANTOS *et al.*, 2014). Já o parâmetro LQ, indica a menor quantificação possível para uma variável dentro de um determinado método avaliado (CASSINI; ANTUNES; KELLER, 2013). Em trabalhos de validação de metodologia analítica, o LD e LQ são comumente obtidos, com base nos parâmetros da curva analítica ou na razão sinal e ruído gerados nos equipamentos eletrônicos (SANTOS, 2018; PAGAN *et al.*, 2019).

A seletividade é o parâmetro responsável pela certeza da identificação pelo método para a variável de resposta trabalhada, obtendo assim a relação de impurezas e interferentes que possam gerar identificações falsas no método estudado (IAMMARINO; MARINO; ALBENZIO, 2017). Esse parâmetro deve ser continuamente verificado no decorrer dos testes para os demais parâmetros (GOES JUNIOR *et al.*, 2019; PAGAN *et al.*, 2019).

A repetitividade busca verificar a concordância dos valores coletados para uma metodologia, obtidos nas mesmas condições de laboratório, equipamento, operadores, entre outras variáveis, que possam influenciar o método, enquanto a reprodutibilidade busca a concordância dos resultados obtidos para a mesma amostra e método, mas em condições distintas, como equipamentos de mesmo modelo, porém diferentes analistas e laboratórios distintos (CHAWLA *et al.*, 2016; SANTOS, 2018). Ambos os parâmetros devem encontrar seus limites de divergência dentro dos resultados aceitáveis segundo metodologia de validação seguida (AGUIAR JÚNIOR *et al.*, 2018).

Pequenas variações são impossíveis de serem excluídas dos testes, estando presentes tanto na repetitividade quanto na reprodutibilidade, gerando os erros aleatórios (AGUIAR

JÚNIOR *et al.*, 2018). Como forma de relativizar essas divergências, o parâmetro robustez mede a sensibilidade do método analítico quanto a essas variações (LEGRAND *et al.*, 2018).

Uma boa robustez indica que o método se mantém confiável e exato no que diz respeito às oscilações. Nos testes de validação, a robustez é avaliada, por meio de uma pequena variação de parâmetros conhecidos, sendo então verificada a sua influência na resposta (IAMMARINO; MARINO; ALBENZIO, 2017; PAGAN *et al.*, 2019).

O processo de identificação e quantificação de substâncias de interesse em produtos vegetais inclui o uso de cromatografia. Existem diferentes tipos de técnicas cromatográficas, como, por exemplo, fase móvel (líquida e gasosa) e fase estacionária (troca iônica, sílica de fase normal e reversa) e cromatografia em camada delgada (THAMMANA, 2016).

Uma fonte de grande obtenção de metodologias analíticas é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), do inglês "High Performance Liquid Chromatography" (HPLC) (GOUTAL *et al.*, 2016). A cromatografia trabalha na separação dos compostos presentes em uma matriz, de acordo com seu tempo de retenção ou eluição, influenciado pela interação da amostra, arrastada pela fase móvel (LUCIANI-GIACOBBE *et al.*, 2018; QI *et al.*, 2015).

CLAE-UV é uma forma de cromatografia em coluna que bombeia em alta pressão uma amostra (analito) dissolvida em um solvente (fase móvel) por uma coluna com um material de embalagem cromatográfico imobilizado (fase estacionária). As propriedades da amostra e do solvente, bem como a natureza da fase estacionária, determinam o tempo de retenção dos analitos. À medida que a amostra passa pela coluna, os analitos com as interações mais fortes com a fase estacionária saem da coluna mais lentamente, o que significa que exibem tempos de retenção mais longos. Ao sair da coluna, a fase móvel passa por um módulo de detecção de absorvância na região do ultravioleta (UV) (PETROVA; SAUER, 2017). Os detectores UV são amplamente utilizados na cromatografia líquida, apresentando boas faixas de detecção (sensibilidade de aproximadamente 10 a 9 g mL⁻¹) e robustez, enquanto são viáveis economicamente (SCHWEIKART; HULTHE, 2019). Esses detectores relacionam a absorção do composto com a sua concentração, lei de Lambert-Beer (LEGRAND *et al.*, 2018).

A CLAE-UV é amplamente utilizada na detecção e determinação de inúmeros compostos e ensaios analíticos, encontrando forte aplicação para a indústria farmacêutica e de pesticidas que encontram no método a descrição completa das formulações e suas propriedades químicas (OHIRA *et al.*, 2018).

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N. *et al.* Nitrogênio e fósforo na produção vegetal e na indução de mucilagem em plantas de insulina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 4, p. 536-540, 2002.
- AGUIAR JÚNIOR, C. A. S. *et al.* Solid-phase extraction of pesticide residues from surface water using a lab-made lower-retention sorbent. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, n. 6, p. 641-647, 2018.
- AL-RAJHY, D. H. *et al.* Acaricidal effects of cardiac glycosides, azadirachtin and neem oil against the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 11, p. 1250-1254, 2003.
- ALMEIDA, B. R. *et al.* Macronutrient omission changes *Lippia gracilis* Schauer, a threatened medicinal plant, growth and volatile chemical composition. **HortScience**, Alexandria, v. 53, n. 12, p. 1877-1882, 2018.
- ALVARENGA, I. C. A. **Lâminas de irrigação e omissão de nutrientes no cultivo in vivo e luz e TDZ na micropropagação e constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L.** 2013. 135 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- ALVARENGA, I. C. A. *et al.* Effects on growth, essential oil content and composition of the volatile fraction of *Achillea millefolium* L. cultivated in hydroponic systems deficient in macro and microelements. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 197, p. 329-338, 2015.
- ALVES, A. C. *et al.* Biomass production and essential oil of lemon balm cultivated under colored screens and nitrogen. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 1, p. 94-99, 2018.
- ANAND, U. *et al.* A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**, Basel, v. 9, n. 11, p. 258, 2019.
- ARAÚJO, J. S. **Desenvolvimento vegetal, produção e composição química do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) em função do fornecimento de N, P, K e B e da aplicação de ácido jasmônico.** 2007. 72 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- ARDELEAN, M.; COSTEA, A.; CORDEA, M. Breeding foxglove (*Digitalis* sp.) for ornamental and/or medical purposes. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**, Cluj-Napoca, v. 63, p. 22-31, 2006.
- ASENSIO, V. *et al.* Potassium fertilization increases hydraulic redistribution and water use efficiency for stemwood production in *Eucalyptus grandis* plantations. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 176, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847220301118>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- ATKINSON, R. R. L. *et al.* A non-targeted metabolomics approach to quantifying differences

in root storage between fast- and slow-growing plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 196, n. 1, p. 200-211, 2012.

BADKE, M. R. *et al.* Plantas medicinais na prática do cotidiano popular. **Revista Escola Anna Nery**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2012.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Ed. Unicamp, 2002. v. 1, 401 p.

BENEVIDES, C. M. J. *et al.* HSSPME/ GC-MS analysis of VOC and multivariate techniques applied to the discrimination of Brazilian varieties of mango. **American Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 5, n. 3, p. 157-164, 2014.

BENLI, M. *et al.* Antimicrobial activity of endemic *Digitalis lamarckii* Ivan from Turkey. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 47, p. 218-221, 2009.

BERTOL, J. W. *et al.* Anti-herpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 92, p. 73-80, 2011.

BETTINGER, A. A. contribution about the knowledge of the forest communities of the saarland (Germany). **Gedrag en Organisatie**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 6-37, 2020.

BIASI, L. A. *et al.* Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 1, p. 35-39, jan. 2009.

BONFANTI, L. *et al.* In the kingdom of “tortelli” (Ravioli-like pasta) plant poisoning is still a threat: a case report of near-fatal poisoning from *Digitalis Purpurea* accidentally confused with *Borago Officinalis*. **Acta Biomedica**, Parma, v. 87, n. 3, p. 353-357, 2016.

BRAGA, G. A.; VIRIATO, M. D. **O uso do carvedilol na insuficiência cardíaca: um estudo de revisão**. 2010. 40 p. Monografia (Pós-Graduação em Medicina) - Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

BRANDÃO FILHO, J. U. T. *et al.* **Hortaliças-fruto**. Maringá: EDUEM, 2018. 535 p.

BRANT, R. S. *et al.* Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 1401-1407, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. Determinar a publicação do "Guia para Validação de Métodos Analíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 141, 25 jul. 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 10 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 maio 2003. Disponível em: <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132>. Acesso em: 28 fev. 2021.

BRÄUCHLER, C.; MEIMBERG, H.; HEUBL, G. Molecular phylogeny of the genera *Digitalis* L. and *Isoplexis* (Lindley) Loudon (Veronicaceae) based on ITS and trnL-F sequences. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 248, p. 111-128, 2004.

BRUELHEIDE, H.; HEINEMEYER, A. Climatic factors controlling the eastern and altitudinal distribution boundary of *Digitalis purpurea* L. in Germany. **Flora**, London, v. 197, n. 6, p. 475-490, 2002.

CACHO, M. *et al.* Effect of calcium restriction on cardenolide accumulation in two cell lines of *Digitalis thapsi* grown under different light regimes. **Acta Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 21, p. 335-340, 1999.

CACHO, M. *et al.* Morphogenesis in leaf, hypocotyl and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, p. 117-123, 1991.

CAIONE, G.; LANGE, A.; SCHONINGER, E. L. Crescimento de mudas de *Schizolobium amazonicum* (Huber ex Ducke) em substrato fertilizado com nitrogênio, fósforo e potássio. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 94, p. 213-221, 2012.

CANDIOTI, L. V. *et al.* Experimental design and multiple response optimization: using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, London, v. 124, p. 123-138, 2014.

CARDANO, S. *et al.* A dangerous "risotto": an unusual digitalis poisoning case. **Recenti Progressi in Medicina**, Rome, v. 93, n. 4, p. 245-246, 2002.

CARLOS, L. *et al.* Crescimento e nutrição mineral de mudas de pequi sob efeito da omissão de nutrientes. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 13-21, jan./mar. 2014.

CASSINI, S. T. A.; ANTUNES, P. W. P.; KELLER, R. Validação de método analítico livre de acetoneitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 8, p. 1208-1213, 2013.

CENTOFANTE, A. R. Light quality on the morphoanatomy and physiology of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. seedlings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 259, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030442381930651X>. Acesso em: 10 mar. 2021.

CHAWLA, S. *et al.* Development and validation of multiresidue analytical method in cotton and groundnut oil for 87 pesticides using low temperature and dispersive cleanup on gas chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, n. 408, p. 983-997, 2016.

CHELLINI, P. R. *et al.* Development and validation of an HPLC method for simultaneous determination of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol hydrochloride in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 98, p. 1234-1239, 2015.

CHOUHDARY, S. *et al.* Effects of boron toxicity on growth, oxidative damage, antioxidant enzymes and essential oil fingerprinting in *Mentha arvensis* and *Cymbopogon flexuosus*. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, London, v. 7, n. 1, 2020. Disponível em: <https://chembioagro.springeropen.com/articles/10.1186/s40538-019-0175-y>. Acesso em: 10 mar. 2021.

CINGOZ, G. S.; GUREL, E. Effects of salicylic acid on thermotolerance and cardenolide accumulation under high temperature stress in *Digitalis trojana* Ivanina. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 105, p. 145-149, 2016.

CINGOZ, G. S.; VERMA, S. K.; GUREL, E. Hydrogen peroxide-induced antioxidant activities and cardiogenic glycoside accumulation in callus cultures of endemic *Digitalis* species. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 82, p. 89-94, 2014.

CLARK, E. M. R. *et al.* Vase life of new cut flower cultivars. **HortTechnology**, Alexandria, v. 20, n. 6, p. 1016-1025, 2010.

CLEMENTE, E. S. *et al.* *Digitalis*. In: KOLE, C. (ed.). **Wild crop relatives: genomic and breeding resources, plantation and ornamental crops**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 73-112.

COELHO, E. R. C. *et al.* Development and validation of analytical method for analysis of 2, 4-D, 2, 4-DCP and 2, 4, 5-T for monitoring of public water supply. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 1043-1051, 2018.

COLE, D. L. *et al.* Mineral nutrient deficiencies in quinoa grown in hydroponics with single nutrient salt/acid/chelate sources. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 43, n. 11, p. 1661-1673, 2020.

CORREIA, R. M. *et al.* Crescimento de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de folhas de orégano sob malhas coloridas. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 5, n. 1, p. 11-22, 2012.

CUZZUOL, G. R. F. *et al.* Soluções nutritivas para o cultivo e a produção de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, p. 911-917, 2008.

DANIEL, M. **Medicinal plants: chemistry and properties**. New York: Science, 2006. 128 p.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. New York: John Wiley, 2009. 550 p.

DURAND, E.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. From green chemistry tonature: the versatile role of low transition temperature mixtures. **Biochimie**, Paris, v. 120, p. 119-123, 2016.

ELAD, Y. *et al.* Effect of colored shade nets on Pepper powdery Mildew (*Leveillula taurica*). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 35, n. 3, p. 285-299, 2007.

FAQUIN, V.; ANDRADE, A. T. **Nutrição mineral e diagnose do estado nutricional de hortaliças**. Lavras: Ed. UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.

FARAH, S. *et al.* Diuretic & anti-urolithic activity of some crude extracts. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, Sikar, v. 7, n. 1, p. 128-131, 2015.

FATIMA, Z. *et al.* Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates. **Turkish Journal of Botany**, Sohag, v. 33, p. 393-405, 2009.

FEITOSA, D. G. *et al.* Crescimento de mudas de gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) sob diferentes fontes e doses de nitrogênio. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 3, p. 401-411, 2011.

FIGUEIREDO, J. R. M. *et al.* Temperature, photoperiod and colored shade nets on the in vitro development of *Physalis peruviana* L. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 1205, p. 757-762, 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: analytical procedures and methods validation for drugs and biologics**. 2014. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2021.

FREITAS, H.; PRASAD, M. N. V.; PRATAS, J. Analysis of serpentinophytes from north-east of Portugal for trace metal accumulation: relevance to the management of mine environment. **Chemosphere**, Oxford, v. 54, n. 11, p. 1625-1642, 2004.

FREITAS, M. S. M.; MONNERAT, P. H.; VIEIRA, I. J. C. Mineral efficiency in *Passiflora alata* Curtis: vitexin bioproduction. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 31, p. 1844-1854, 2008.

FUJINO, T. *et al.* Cardenolide glycosides from the seeds of *Digitalis purpurea* exhibit carcinoma-specific cytotoxicity toward renal adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 79, n. 2, p. 177-184, 2015.

GAFFAL, K. P.; FRIEDRICH, G. J.; EL-GAMMAL, S. Ultrastructural evidence for a dual function of the phloem and programmed cell death in the floral nectary of *Digitalis purpurea*. **Annals of Botany**, London, v. 99, n. 4, p. 593-607, 2007.

GAFFAL, K. P.; HEIMLER, W.; EL-GAMMAL, S. The floral nectary of *Digitalis purpurea* L., structure and nectar secretion. **Annals of Botany**, London, v. 81, n. 2, p. 251-262, 1998.

GANAPATY, S. *et al.* A review of phytochemical studies of *Digitalis* species. **Journal of Natural Remedies**, Bangalore, v. 3, n. 2, p. 104-128, 2003.

GARIBALDI, A. *et al.* First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Digitalis purpurea* in Italy. **Plant Disease**, Quebec, v. 103, n. 7, p. 1770, 2019.

GARLET, T. *et al.* Crescimento e teor de óleo essencial de mentas com diferentes concentrações de potássio na solução nutritiva. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, p. 230-237, 2007.

GIORGI, A. *et al.* Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). **Food Chemistry**, Oxford, v. 114, n. 1, p. 204-211, 2009.

GOES JUNIOR, E. J. A. *et al.* Validation of a spectro photometric method for quantification of acetyl salicylic acid in pharmaceutical formulations: a proposal of experimental activity for instrumental analysis. **Química Nova**, São Paulo, v. 42, p. 99-104, 2019.

GONDIM, A. R. O. *et al.* Eficiência nutricional do milho cv. BRS 1030 submetido à omissão de macronutrientes em solução nutritiva. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 4, p. 539-544, 2010.

GOOGLE IMAGENS. Disponível em:

[https://www.google.com/search?q=H%C3%A1bito+de+Digitalis+mariana+ssp.+heywoodii&sxsr=APq-](https://www.google.com/search?q=H%C3%A1bito+de+Digitalis+mariana+ssp.+heywoodii&sxsr=APq-WBtKUILMbSjsVKblzungbdm_C0Pu8g:1643334701235&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjWp_ToqtP1AhURHbkGHRo7BPYQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1366&bih=617&dpr=1)

[WBtKUILMbSjsVKblzungbdm_C0Pu8g:1643334701235&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjWp_ToqtP1AhURHbkGHRo7BPYQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1366&bih=617&dpr=1](https://www.google.com/search?q=H%C3%A1bito+de+Digitalis+mariana+ssp.+heywoodii&sxsr=APq-WBtKUILMbSjsVKblzungbdm_C0Pu8g:1643334701235&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjWp_ToqtP1AhURHbkGHRo7BPYQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1366&bih=617&dpr=1). Acesso em: 10 mar. 2021.

GOUTAL, S. *et al.* Validation of a simple HPLC-UV method for rifampicin determination in plasma: Application to the study of rifampicin arterio venous concentration gradient. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, n. 123, p. 173-178, 2016.

GRINDELAND, J. M. Inbreeding depression and outbreeding depression in *Digitalis purpurea*: optimal outcrossing distance in a tetraploid. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 21, n. 3, p. 716-726, 2008.

GRINDELAND, J. M.; SLETVOLD, N.; IMS, R. A. Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*. **Functional Ecology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 383-390, 2005.

GUREL, E. *et al.* Regeneration and cardiogenic glycoside production in *Digitalis davisiana* Heywood (Alanya foxglove). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, n. 2, p. 217-225, 2011.

HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T.; OBI, Y. Studies on the production of Digitalis cardenolides by plant tissue culture: II., effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. **Plant Physiology**, Washington, DC, v. 69, p. 653-656, 1982.

HAY, F.; PROBERT, R.; COOMBER, S. Development of desiccation tolerance and longevity in seeds from detached capsules of foxglove (L.). **Annals of Botany**, London, v. 79, p. 419-427, 1997.

HEEGER, E. F. **Handbush des Arznei- und Gewürzpflazenbaues (*Digitalis lanata* Ehril, *Wolliger Fingerbut*, *Digitalis purpurea* L, *Roter Fingerbut*, andere *Digitalis*-Arten).** Berlin: Bauernverlag, 1956. 388 p.

HENRIQUE, P. C. *et al.* Crescimento de mudas de café sob malhas coloridas. *In*: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais [...]**. Brasília, DF: Embrapa-Café, 2011. p. 6.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil.** Berkeley: University of California, 1950. 347 p. (California Agricultural Experimental Station).

HUFNAGEL, B. *et al.* High-quality genome sequence of white lupin provides insight into soil exploration and seed quality. **Nature Communications**, London, v. 11, n. 1, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-14197-9>. Acesso em: 10 mar. 2021.

HUSSAIN, M. *et al.* Efficacy of fertilizing method for different potash sources in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) nutrition under arid climatic conditions. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 1, 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0228335>. Acesso em: 10 mar. 2021.

IAMMARINO, M.; MARINO, R.; ALBENZIO, M. Howmeaty: detection and quantification of adulterants, foreign proteins and food additives in meat products. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 52, p. 851-863, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008.** Brasília, DF: Inmetro, 2018.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **ICH harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96).** London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Grandezas, unidades e símbolos em físico-química:** green book. Zurich: IUPAC, 2018. Disponível em: <http://www.sbq.org.br/livroverde/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

JANPEN, C. *et al.* Physiological responses of hydroponically-grown Japanese mint under nutrient deficiency. **PeerJ**, Berkeley, v. 2019, n. 9, p. 1-19, 2019.

JANSEN, C.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. Glufosinate metabolism in excised shoots and leaves of twenty plant species. **Weed Science**, Champaign, v. 48, n. 3, p. 319-326, 2000.

JANSSEN, R. M.; BERG, M.; OVAKIM, D. H. Two cases of cardiac glycoside poisoning from accidental foxglove ingestion. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 188, n. 10, p. 747, 2016.

JIN, Q. *et al.* Phenylethanoid Glycosides from *Digitalis purpurea* L. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, Seoul, v. 32, n. 5, p. 1721-1724, 2011.

KAIRUZ, E. *et al.* Enhancement of cardenolide production in transgenic *Digitalis purpurea* L. by expressing a progesterone-5 β -reductase from *Arabidopsis thaliana* L. **Industrial Crops and Products**, London, v. 146, Apr. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020300820>. Acesso em: 10 mar. 2021.

KAROWE, D. N.; GOLSTON, V. Effect of the cardenolide digitoxin on performance of gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera: Lymantriidae) caterpillars. **Great Lakes Entomologist**, East Lansing, v. 39, n. 1/2, p. 34-39, 2006.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. 452 p.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B. Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition. **Food Chemistry**, London, v. 142, p. 334-341. 2014.

KOZERA, W.; MAJCHERCZAK, E. Content of macronutrients and values of mole ratios in leaves of the woolly foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh.) cultivated under differentiated mineral fertilization. **Journal of Elementology**, Olsztyn, v. 16, n. 4, p. 555-565, 2011.

KRAVCHENKO, A. V. *et al.* New and rare for Karelia vascular plants. **Turczaninowia**, Barnaul, v. 21, n. 2, p. 40-46, 2018.

KREIS, W. The Foxgloves (*Digitalis*) revisited. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 83, n. 12/13, p. 962-976, 2017.

KREIS, W. *et al.* Storage of cardenolides in *Digitalis lanata* cells: effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cardenolide uptake and release. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, n. 20, p. 191-199, 1990.

KREIS, W.; HAUG, B.; YÜCESAN, B. Somaclonal variation of cardenolide content in Heywood's foxglove, a source for the antiviral cardenolide glucoevatromonoside, regenerated from permanent shoot culture and callus. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**, Wallingford, v. 51, p. 35-41, Feb. 2015.

KREIS, W.; HENSEL, A.; STUHLEMMER, U. Cardenolide biosynthesis in Foxglove. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, p. 491-499, 1998.

KRISHNA, A. B. *et al.* Plant Cardenolides in therapeutics. **International Journal of Indigenous Medicinal Plants**, London, v. 48, n. 2, p. 1871-1896, 2015.

KULIKOV, A. *et al.* Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Alberta, v. 1768, p. 1691-1702, 2007.

LACASSIE, E. *et al.* A non-fatal case of intoxication with foxglove, documented by means of liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Journal of Forensic Sciences**, Philadelphia, v. 45, n. 5, p. 1154-1158, 2000.

LEGRAND, P. *et al.* Development of an HPLC/UV method for the evaluation of extractables and leachables in plastic: application to a plastic-packaged calcium gluconate glucoheptonate solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 155, p. 298-305, 2018.

LEUSCHNER, C. Air humidity as an ecological factor for woodland herbs: leaf water status, nutrient uptake, leaf anatomy, and productivity of eight species grown at low or high vpd levels. **Flora**, London, v. 197, n. 4, p. 262-274, 2002.

LI, C.; WANG, M. C. Application of hairy root culture for bioactive compounds production in medicinal plants. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Sharjah, v. 22, n. 5, p. 584-600, 2021.

LICHIUS, J. J.; MELZHEIMER, V.; WICHTL, M. Vergleichende Untersuchungen des Cardenolidspektrums der vier Varietäten von *Digitalis subalpina* Br.-Bl. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 58, n. 1, p. 102-104, 1992.

LIMA, V. A. *et al.* Growth, photosynthetic pigments and production of essential oil of long-pepper under different light conditions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 1167-1174, 2017.

LIN, C. C. *et al.* An outbreak of foxglove leaf poisoning. **Journal of the Chinese Medical Association**, Taipei, v. 73, n. 2, p. 97-100, 2010.

LINDHOLM, P. *et al.* Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of fractionated plant extracts. **Journal of Biomolecular Screening**, Watertown, v. 7, n. 4, p. 333-340, 2002.

LOPES, V. *et al.* Macronutrient suppression in nutrient solution alters the growth and citral content of *Cymbopogon flexuosus*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 320-328, 2019.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, New Jersey, v. 11, p. 1043-1053, 2007.

LÓPEZ-LÁZARO, M. *et al.* Anti-tumour activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. *heywoodii*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 8, p. 701-704, 2003.

LUCIANI-GIACOBBE, L. C. *et al.* Validation of a simple isocratic HPLC-UV method for rifampicin and isoniazid quantification in human plasma. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Gwalior, v. 8, p. 93-99, 2018.

LUCKNER, M.; WICHTL, M. **Digitalis**: geschichte, biologie, chemie, physiologie, molekularbiologie, pharmakologie, medizinische anwendung. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2000.

LUNGEANU, I.; CALCANDI, V.; CALCANDI, I. Kariologische und phytochemische untersuchungen uber *Digitalis purpurea* L. ssp. heywoodii. **Die Naturwissenschaften**, London, v. 21, p. 673-674, 1963.

MACEDO, A. F. *et al.* The effect of light quality on leaf production and development of in vitro-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 70, n. 1, p. 43-50, 2011.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MARTINS, E. R. *et al.* **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2000.

MARTINS, J. R. *et al.* Anatomia foliar de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/5qkynSqchvXFMcwR8pRhF7C/?lang=pt>. Acesso em: 10 mar. 2021.

MARTINS, J. R. *et al.* Avaliação do crescimento e do teor de óleo essencial em plantas de *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 102-107, 2008.

MATTOS, J. K. A. **Plantas medicinais: aspectos agrônômicos**. Brasília, DF: Ed. UNB, 1989.

MEKHAIL, T. *et al.* Phase 1 trial of Anvirzel™ in patients with refractory solid tumors. **Investigational New Drugs**, Boston, v. 24, p. 423-427, 2006.

MIJATOVIC, T. *et al.* Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. **Neoplasia**, New York, v. 8, p. 402-412, 2006.

MIJATOVIC, T. *et al.* Cardiotoxic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta: cancer**, Amsterdam, v. 1776, p. 32-57, 2007.

MITCHELL, A. Bitter pill to swallow: a case of accidental poisoning with *Digitalis purpurea*. **BMJ Case Reports**, London, v. 2010, Oct. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22791473/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

MOCHIZUKI, R. Y. **Dedaleira**. 2014. Disponível em: <http://www.uepg.br/fitofar/dados/dedaleira.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2018.

MOHAMMED, A. *et al.* In vitro regeneration and cardenolide determination of an endemic foxglove, *Digitalis cariensis* (Aegean Foxglove). **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 51, p. 438-444, 2015.

MOREIRA, H. *et al.* Heavy metal accumulation in plant species indigenous to a contaminated Portuguese site: prospects for phytoremediation. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 221, n. 1/4, p. 377-389, 2011.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. **Micropropagation of Woody Trees and Fruits**, London, v. 75, p. 3-35, 2003.

MUNKERT, J. *et al.* Production of the cytotoxic cardenolide glucoevatromonoside by semisynthesis and biotransformation of evatromonoside by a *Digitalis lanata* cell culture. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 83, n. 12/13, p. 1035-1043, 2017.

MURCHIE, E. H.; HORTON, P. Contrasting patterns of photosynthetic acclimation to the light environment are dependent on the differential expression of the responses to altered irradiance and spectral quality. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 139-148, 1998.

NARTOP, P. Silver nanoparticles: ecofriendly surface sterilization of plant seeds in different shapes and sizes. **Journal of Animal and Plant Sciences**, Lahore, v. 29, n. 2, p. 453-460, 2019.

NASCIMENTO, M. E. *et al.* Plasticidade foliar e produção de biomassa seca em *Copaifera langsdorffii* Desf. Cultivada sob diferentes espectros de luz. **Revista de Ciências Agrárias: Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Belém, v. 57, n. 1, p. 41-48, 2014.

NAVARRO, E. *et al.* Cardiovascular activity of a methanolic extract of *Digitalis purpurea* ssp. *heywoodii*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 71, n. 3, p. 437-442, 2000.

NAZIR, R.; RESHI, Z.; WAFAI, B. A. Reproductive ecology of medicinally important Kashmir Himalayan species of *Digitalis* L. **Plant Species Biology**, Hoboken, v. 23, n. 2, p. 59-70, 2008.

NEGI, J. S. *et al.* Determination of mineral contents of *Digitalis purpurea* L. and *Digitalis lanata* Ehrh. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 12, n. 3, p. 463-469, 2012.

NEUHÄUSLOVÁ, Z.; HÄRTEL, H. *Digitalis purpureae*-Epilobietum in the Czech Republic. **Polish Botanical Journal**, Krakow, v. 46, n. 2, p. 211-218, 2001.

NEWMAN, R.; YANG, P.; PAWLUS, A. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. **Molecular Interventions**, Bethesda, v. 8, p. 36-49, 2008.

NOVAES, C. G. *et al.* Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta: parte I: variáveis de processo. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, p. 1184-1215, 2017.

NUNES, A. A. *et al.* Effect of nutrient omission in the development of sunflower BRS-122 in greenhouse conditions. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, Medellín, v. 72, n. 1, p. 8663-8671, 2019.

OH, J. W. *et al.* Effects of phenylethanoid glycosides from *Digitalis purpurea* L. on the expression of inducible nitric oxide synthase. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 57, n. 7, p. 903-910, 2005.

- OHIRA, S. *et al.* Universal HPLC detector for hydrophilic organic compounds by means of total organic carbon detection. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 90, n. 11, p. 6461-6467, 2018.
- OLIVEIRA, G. C. *et al.* Photosynthetic behavior, growth and essential oil production of *Melissa officinalis* L. cultivated under colored shade nets. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago de Chile, v. 76, n. 1, p. 123-128, 2016.
- OLMSTEAD, R. *et al.* Disintegration of the Scrophulariaceae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 2, p. 348-361, 2001.
- ORCZYK, M.; WOJCIECHOWSKI, K.; BREZESINSKI, G. Disordering effects of digitonin on phospholipid monolayers. **Langmuir**, Morgantown, v. 33, n. 15, p. 3871-3881, 2017.
- ORCZYK, M.; WOJCIECHOWSKI, K.; BREZESINSKI, G. The influence of steroidal and triterpenoid saponins on monolayer models of the outer leaflets of human erythrocytes, *E. coli* and *S. cerevisiae* cell membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 563, p. 207-217, 2020.
- OREN-SHAMIR, O. M. *et al.* Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p. 353-361, 2001.
- PAGAN, F. *et al.* Validação de método analítico para quantificação do Fipronil por cromatografia líquida de alta eficiência. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 16, n. 29, p. 2457-2471, 2019.
- PAPONE, M.; ALBA, M.; FATTA, N. A *Digitalis purpurea* elite population starting from a population grown wild. **BAG - Journal of Basic and Applied Genetics**, Buenos Aires, v. 19, n. 1, p. 21-25, 2008.
- PATEL, M.; PATEL, D. A.; GAJRA, B. Validation of analytical procedure: methodology. **International Journal of Pharmaceutical Innovations**, Berne, v. 1, n. 2, p. 45-50, 2011.
- PATIL, J. G. *et al.* In vitro propagation and production of cardiotoxic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 6, p. 2379-2393, 2013.
- PATIL, S. T.; AHIRRAO, R. A.; PAWAR, S. P. A short review on method validation. **Journal of Pharmaceutical and BioSciences**, Noida, v. 5, n. 4, p. 30-37, 2017.
- PEREIRA, B. Frutas finas. **Revista Frutas e Derivados**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 14-18, 2007.
- PÉREZ-ALONSO, N. P. *et al.* Cardiotoxic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 151-156, 2009.
- PÉREZ-ALONSO, N. P. *et al.* Efficient direct shoot organogenesis, genetic stability and secondary metabolite production of micropropagated *Digitalis purpurea* L. **Industrial Crops and Products**, London, v. 116, p. 259-266, 2018.

PEREZ-BERMUDEZ, P.; CORNEJO, M. J.; SEGURA, J. *In vitro* propagation of *Digitalis obscura* L. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 30, p. 77-82, 1983.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1657, p. 33-43, 2017.

PLATZ, E. A. *et al.* Re: a novel two-stage, transdisciplinary study identifies digoxin as a possible drug for prostate cancer treatment. **Cancer Discovery**, Philadelphia, v. 1, p. 68-77, 2011.

PRATAS, J. *et al.* Heavy metals in soil and spontaneous flora in a lead mine area, Barbadalhos mine, Central Portugal. **Comunicacoes Geologicas**, Lisboa, v. 101, p. 1047-1050, 2014.

PRATAS, J. *et al.* Phytoremedial assessment of flora tolerant to heavy metals in the contaminated soils of an abandoned Pb mine in Central Portugal. **Chemosphere**, Oxford, v. 90, n. 8, p. 2216-2225, 2013.

PRATAS, J. *et al.* Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 99-107, 2005.

PRESTON, J. C.; MARTINEZ, C. C.; HILEMAN, L. C. Gradual disintegration of the floral symmetry gene network is implicated in the evolution of a wind-pollination syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 108, n. 6, p. 2343-2348, 2011.

PROBERT, R. *et al.* Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 55, n. 3, p. 326-335, 2007.

QI, P. *et al.* Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 181, p. 101-110, 2015.

RAMLAKHAN, S. L.; FLETCHER, A. K. It could have happened to Van Gogh: a case of fatal purple foxglove poisoning and review of the literature. **European Journal of Emergency Medicine**, Paris, v. 14, n. 6, p. 356-359, 2007.

RAVI, B. G. *et al.* Profiling and structural analysis of cardenolides in two species of *Digitalis* using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1618, May 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32035664/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

RAVISANKAR, P. *et al.* Development and validation of rapid RP-HPLC method for the determination of azathioprine in bulk and pharmaceutical dosage form. **Der Pharmacia Lettre**, Dalian, v. 7, p. 85-95, 2015.

REDMAN, P. B. *et al.* Postharvest handling of nine specialty cut flower species. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 92, n. 3/4, p. 293-303, 2002.

- RESENDE, S. V. *et al.* Influência da luz e substrato na germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de *Calliandra benth.* (Mimosoideae - Leguminosae) endêmicas da chapada diamantina, Bahia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 107-117, 2011.
- RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- ROCA-PÉREZ, L. *et al.* Relationships among soil characteristics, plant macronutrients, and cardenolide accumulation in natural populations of *Digitalis obscura*. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tharandt, v. 168, p. 774-780, 2005.
- ROSAL, L. F. *et al.* Características fisiológicas de plantas de boldo pequeno cultivadas sob malhas fotoconversoras. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 2, 2008. 1 CD-ROM.
- ROTHER, K. *et al.* Uptake of phloem-specific cardenolides by *Cuscuta* sp. growing on *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 357-361, 1999.
- SAEVA, J. R.; ATANASOV, P. Cardiac glycoside plants self-poisoning. **Acta Medica Bulgarica**, Sofia, v. 41, n. 1, p. 99-104, 2014.
- SÁEZ, P. L. *et al.* Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant Science**, Shannon, v. 201, p. 12-24, 2003.
- SANTOS, L. G. *et al.* Validação de metodologia analítica para determinação de taninos pelo método de difusão radial. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 881-885, 2014.
- SANTOS, L. M. G. Avaliação das impurezas elementares do medicamento captopril comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 10, n. 3, 2018. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/2587>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- SANTOS, R. C. *et al.* Influência da adubação NPK no rendimento do óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis*. **Orbital: the electronic journal of chemistry**, Campo Grande, v. 2, n. 4, p. 316-326, Oct./Dec. 2010.
- SARKER, U.; OBA, S. Nutrients, minerals, pigments, phytochemicals, and radical scavenging activity in *Amaranthus blitum* leafy vegetables. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-59848-w>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- SCHEINOST, M. E. Digoxin toxicity in a 26-year-old woman taking an herbal dietary supplement. **Journal of the American Osteopathic Association**, Chicago, v. 101, n. 8, p. 444-446, 2001.
- SCHNEIDER, N. F. *et al.* Cardiac glycoside glucoevatromonoside induces cancer type-specific cell death. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 9, p. 70, 2018.

SCHWEIKART, F.; HULTHE, G. HPLC-UV-MS analysis-asource for severe oxidation artifacts. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 91, p. 1748-1751, 2019.

SERRANO, R. *et al.* Application of microscopy to *Digitalis thapsi* x *Digitalis purpurea* natural hybrid identification. In: MÉNDEZ-VILA, A. (ed.). **Microscopy: advances in scientific research and education**. Bajejoz: Formatex Research Center, 2014. p. 377-384. (FORMATEX Microscopy Series, 6).

SHEMATOROVA, E. K. *et al.* Novel interactions of adrenodoxin-related [2Fe-2S] plant ferredoxins MFDX1 and MFDX2 indicate their involvement in a wide spectrum of functions in plant mitochondria. **Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: natural, exact, and applied sciences**, Warsaw, v. 73, n. 6, p. 478-486, 2020.

SILVA, G. M. da. **Adubação orgânica, micropropagação e validação analítica para doseamento de cardenólídeos totais em *Digitalis purpúrea* subs. *heywoodii***. 2017. 105 p. Tese (Doutorado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

SILVA, J. V. S. da. **Contribuição para o estudo molecular e morfológico de espécies do género *Digitalis* L.** 2012. 68 f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

SILVA, K. G. *et al.* Nitrogen efficiency indexes for evaluating nitrogen uptake and use in ornamental bromeliad's root system and tank. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, DF, v. 53, n. 6, p. 703-709, jun. 2018.

SILVA, M. V. T. *et al.* Eficiência agrônômica e fisiológica na melancia fertirrigada com diferentes doses de nitrogênio e fósforo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 9, n. 2, p. 264-269, 2014.

SILVA, R. C. **Produção vegetal processos, técnicas e formas de cultivo**. São Paulo, 2019.

SILVEIRA, T. A. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: SAGAH, 2019.

SINGH, M.; ROUTLEDGE, P. A. Poisoning by toxic plants and fungi. **Medicine**, London, v. 48, n. 3, p. 218-219, 2020.

SLAUGHTER, R. J. *et al.* Poisonous plants in New Zealand: a review of those that are most commonly enquired about to the national poisons centre. **New Zealand Medical Journal**, Wellington, v. 125, n. 1367, p. 87-118, 2012.

SLETVOLD, N.; GRINDELAND, J. M. Floral herbivory increases with inflorescence size and local plant density in *Digitalis purpurea*. **Acta Oecologica**, New York, v. 34, n. 1, p. 21-25, 2008.

SLETVOLD, N.; RYDGREN, K. Population dynamics in *Digitalis purpurea*: the interaction of disturbance and seed bank dynamics. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 95, n. 6, p. 1346-1359, Nov. 2007.

- SOUZA, G. S. *et al.* Características biométricas e fisiológicas de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 330-335, 2010.
- SOUZA, G. S. *et al.* Crescimento, produção de biomassa e aspectos fisiológicos de plantas de *Mentha piperita* L. cultivadas sob diferentes doses de fósforo e malhas coloridas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 36-42, 2012.
- SOUZA, G. S. *et al.* Crescimento, teor de óleo essencial conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 24, n. 3, p. 1-11, set. 2011.
- SOUZA, G. S. *et al.* Vegetative growth and yield of essential oil of the rosemary plants development when cultivated under colored screens. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 232-239, 2014. Suplemento 1.
- SOUZA, M. A. A. *et al.* Produção de biomassa e óleo essencial de hortelã em hidroponia em função de nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 1, p. 41-48, 2007.
- STAATS, D.; HILLOCK, D.; KLETT, J. E. Weed control and phytotoxicity of preemergence herbicides applied to container-grown herbaceous plants. **HortTechnology**, Alexandria, v. 8, n. 3, p. 325-328, 1998.
- STENKVIST, B. *et al.* Cardiac glycosides and breast cancer revisited. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 306, p. 484, 1982.
- SU, C. T. *et al.* Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 62-70, 2008.
- SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. (ed.). **Analytical method development and validation**. Boca Raton: CRC, 2018.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- TASKOVA, R. M.; GOTFREDSEN, C. H.; JENSEN, S. R. Chemotaxonomic markers in Digitalideae (Plantaginaceae). **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, n. 12, p. 1440-1447, 2005.
- THAMMANA, M. A review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Research & Reviews: journal of pharmaceutical analysis**, Noida, v. 5, p. 22-28, Oct. 2016.
- TIAN, C. *et al.* Balanced fertilization under different plant densities for winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on paddy soils in Southern China. **Industrial Crops and Products**, London, v. 151, Sept. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020303290>. Acesso em: 10 mar. 2021.

- TSAO, D. P. N.; GOMEZ, L. M.; CHAUBAL, M. G. Effect of potassium, nitrogen, and phosphorus on the growth and glycoside accumulation in *Digitalis lanata* L. leaf yield and total glycosides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, DC, v. 50, n. 9, p. 801-802, Sept. 1961.
- VAILLANT, N. *et al.* Use of commercial plant species in a hydroponic system to treat domestic wastewaters. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, n. 2, p. 695-702, 2004.
- VALDÉS, B.; TALAVERA, S.; FERNANDÉZ-GALIANO, E. **Flora vascular de Andalucía Occidental 2**. 2. ed. Barcelona: Kretes, 1987.
- VALERI, S. V.; PIZZAIA, L. G.; CRUZ, A. F. L. Efeitos da omissão de nutrientes em plantas de *Caesalpinia echinata*. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 1, p. 73-80, 2014.
- VAN DELDEN, S. H.; NAZARIDELJOU, M. J.; MARCELIS, L. F. M. Nutrient solutions for *Arabidopsis thaliana*: a study on nutrient solution composition in hydroponics systems. **Plant Methods**, London, v. 16, n. 1, 2020. Disponível em: <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-020-00606-4>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- VELA, S. *et al.* Micropropagation of juvenile and adult *Digitalis obscura* and cardenolide content of clonally propagated plants. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Wallingford, n. 27, p. 143-146, 1991.
- VERMA, S. K. *et al.* Embryogenesis, plant regeneration and cardiac glycoside determination in *Digitalis ferruginea* subsp. *ferruginea* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 119, p. 625-634, 2014.
- VERMA, S. K. *et al.* Enhanced growth and cardenolides production in *Digitalis purpurea* under the influence of different LED exposures in the plant factory. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-36113-9>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- VERMA, S. K. *et al.* In vitro culture of *Digitalis* L. (Foxglove) and the production of cardenolides: an up-to-date review. **Industrial Crops and Products**, London, v. 94, p. 20-21, 2016.
- VISHNUVARTHANAN, M.; RAJESWARI, N. Preparation and characterization of carrageenan/silver nanoparticles/Laponite nanocomposite coating on oxygen plasma surface modified polypropylene for food packaging. **Journal of Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 56, n. 5, p. 2545-2552, 2019.
- VRANCKX, G.; VANDELOOK, F. A season- and gap-detection mechanism regulates seed germination of two temperate forest pioneers. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 14, n. 3, p. 481-490, 2012.

- WANG, Y. *et al.* Comparative analysis of essential oil components in *Pericarpium Citri Reticulatae Viride* and *Pericarpium Citri Reticulatae* by GC-MS combined with chemometric resolution method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 66-74, 2008.
- WHAYNE, T. F. Clinical use of digitalis: a state of the art review. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, New York, v. 18, n. 6, p. 427-440, 2018.
- WILLIS, A. J.; MEMMOTT, J.; FORRESTER, R. I. Is there evidence for the post-invasion evolution of increased size among invasive plant species? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 275-283, 2000.
- WINNICKA, K.; BIELAWSKI, K.; BIELAWSKA, A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, Warsaw, v. 63, p. 109-115, 2006.
- WITHERING, W. **An account of the foxglove and some of its medical uses**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.
- WU, I. L. *et al.* Fatal cardiac glycoside poisoning due to mistaking foxglove for comfrey. **Clinical Toxicology**, Philadelphia, v. 55, n. 7, p. 670-673, 2017.
- WURTELE, E. S. *et al.* Medicinal plants: a public resource for metabolomics and hypothesis development. **Metabolites**, Basel, v. 2, n. 4, p. 1032-1059, 2012.
- XUE, R. *et al.* The cytotoxic activities of cardiac glycosides from *Streptocaulon juvenas* and the structure-activity relationships. **Fitoterapia**, Milano, v. 98, p. 228-233, 2014.
- YADEGARI, M.; SHAKERIAN, A. Effects of micronutrients foliar application on essential oils of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Advances in Environmental Biology**, Amman, v. 8, n. 4, p. 1063-1068, 2014.
- YIN, Z. H.; JOHNSON, G. N. Photosynthetic acclimation of higher plants to growth in fluctuating light environments. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 97-107, 2000.
- YÜCESAN, B. *et al.* Cardenolide estimation in callus-mediated regenerants of *Digitalis lamarckii* Ivanina (Dwarf foxglove). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 50, p. 137-142, 2015.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - VALIDAÇÃO ANALÍTICA, ACÚMULO DE CARDENOLÍDEOS
TOTAIS E GLICOEVATROMONOSÍDEO E CRESCIMENTO VEGETATIVO DE
Digitalis mariana ssp. *heywoodii* SOB MALHAS FOTOCONVERSoras**

**ARTICLE 1 - ANALYTICAL VALIDATION, ACCUMULATION OF TOTAL
CARDENOLIDES, AND GLUCOEVAATROMONOSIDE AND VEGETATIVE
GROWTH OF *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* UNDER PHOTO CONVERTER
SCREENS**

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o
Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

RESUMO

Digitalis mariana ssp. *heywoodii* é uma espécie endêmica de Portugal que biossintetiza, entre outros, um cardenolídeo raro conhecido como glicoevatromonosídeo (GEV). Essa substância natural tem demonstrado resultados antivirais e anticancerígenos promissores. Várias espécies de *Digitalis* demonstraram a influência da luz no teor de cardenolídeos totais. O uso de técnicas de manipulação da qualidade da luz, por meio de malhas coloridas, representa um novo conceito agrotecnológico. Objetivou-se realizar experimentos de otimização extrativa, desenvolvimento e validação analítica por CLAE-DAD, para a quantificação de GEV e avaliar os aspectos morfofisiológicos de crescimento sob o efeito da intensidade e da qualidade espectral da luz transmitida pelas malhas fotoconversoras, em plantas cultivadas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. Os experimentos de otimização extrativa apontaram a razão-droga-vegetal por solvente extrator extrato de 125 mg mL⁻¹, empregando mistura trinária equivolúmica de metanol: etanol:água por sonicação com um ciclo de 31 min como o melhor método para o preparo das amostras. O método cromatográfico desenvolvido foi validado, para a quantificação de GEV em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, apresentando seletividade comprovada, pela pureza do seu pico do extrato e homogeneidade espectral com o padrão de referência, repetibilidade (DPR=1,81), precisão intermediária (DPR=1,75), linear na faixa de 0,0015 a 0,0002 mg mL⁻¹ R²=0,999 e sendo considerado exato em concentrações baixas. O método analítico foi aplicado no seguinte experimento: mudas de *D. mariana* ssp. *heywoodii* foram cultivadas por 30, 60, 90 e 120 dias sob malhas fotoconversoras Cromatinet® (Polysack), com 50% de sombreamento, nas colorações azul, vermelha e preta e o tratamento controle sem o uso de malha. Foram avaliados: número de folhas por planta; biomassas secas de folhas, de raízes e total, relação raiz/parte aérea; análise foliar e teor de cardenolídeos totais (CT), GEV, pigmentos fotossintetizantes e proteína. Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas ao teste de Scott-Knott, ambas a 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2019) foi utilizado para o processamento dos dados. A tela de cor azul proporcionou a maior quantidade de matéria seca de folha (12,69 g), crescimento de raiz (54,00 cm), área foliar (46,97 cm²), teores de proteína (0,118 mg mL⁻¹), clorofila *a* (1,88 mg g⁻¹). Em relação aos cardenolídeos totais, as telas azul e vermelha não apresentaram diferença significativa, ao nível de 5% de significância (2,29% e 2,33%, respectivamente), sendo considerados os melhores tratamentos. Em relação aos cardenolídeos totais, as telas azul e vermelha não apresentaram diferença significativa, ao nível de 5% de significância (2,29% e 2,33%, respectivamente), sendo considerados os melhores tratamentos. Entretanto os maiores teores de GEV foram encontrados apenas em plantas cultivadas sob tela azul (26,0 µg/ 100g de material vegetal). Conclui-se que o cultivo de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* sob malha fotoconversora azul influencia no maior ganho de biomassa seca e comprimento de raiz, biomassa seca e área foliar, clorofila *a*, *b*, carotenoides e clorofila total, proteínas totais e maior acúmulo de cardenolídeos totais e GEV.

Palavra-chave: Otimização extrativa. Qualidade espectral de luz. Dedaleira. Análises multivariadas. Cultivo em campo.

ABSTRACT

Digitalis mariana ssp. *heywoodii* is an endemic species of Portugal that biosynthesizes, among others, a rare cardenolide known as glucoevatromonoside (GEV). This natural substance has shown promising antiviral and anticancer results. Several species of *Digitalis* have demonstrated the influence of light on the total cardenolide content. The use of light quality manipulation techniques through colored screens is a new agrotechnological concept. This paper aimed to conduct extractive optimization, development, and analytical validation experiments by HPLC-DAD to quantify GEV and evaluate the morphophysiological aspects of growth under the effect of the intensity and spectral quality of light transmitted by photo converter screens in cultivated *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* plants. The extractive optimization experiments indicated the ratio-drug-plant by solvent extractor extract of 125 mg mL⁻¹, employing an equivolume ternary mixture of methanol:ethanol:water by sonication with a cycle of 31 min as the best method for preparing the samples. The chromatographic method developed was validated to quantify GEV in *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, presenting selectivity proven by the purity of its peak extract and spectral homogeneity with the reference standard, repeatability (DPR=1.81), intermediate accuracy (DPR=1.75), linear in the range of 0.0015 to 0.0002 mg mL⁻¹ R²= 0.999, and considered accurate at low concentrations. The analytical method was applied in the following experiment: *D. mariana* ssp. *heywoodii* seedlings were cultivated for 30, 60, 90, and 120 days under Cromatinet[®] (Polysack) photo converter screens with 50% shading, in blue, red, and black, using the treatment with no screen as the control. We evaluated the number of leaves per plant, leaf, roots, and total dry biomass, root/aerial part ratio, foliar analysis and total cardenolide (TC) content, GEV, photosynthesizing pigments, and protein. Data were submitted to analysis of variance. The means were compared using the Scott-Knott test at 5% probability. The SISVAR[®] statistical program (FERREIRA, 2019) was used for data processing. The blue screen provided the highest amount of leaf dry matter (12.69 g), root growth (54.00 cm), leaf area (46.97 cm²), protein content (0.118 mg mL⁻¹), and chlorophyll *a* (1.88 mg g⁻¹). The blue and red screens showed no significant difference at the level of 5% significance (2.29% and 2.33%, respectively) for total cardenolides and were considered the best treatments. The blue and red screens showed no significant difference at the level of 5% significance (2.29% and 2.33%, respectively) for total cardenolides and were considered the best treatments. However, the highest levels of GEV were found only in plants cultivated under the blue screen (26.0 µg/100g of plant material). In conclusion, the cultivation of *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* under a blue photo converter screen results in the greater gain of root dry biomass and length, leaf dry biomass and area, chlorophyll *a* and *b*, carotenoids and total chlorophyll, total protein, and greater accumulation of total cardenolides and GEV.

Keywords: Extractive optimization. Spectral quality of light. Foxglove. Multivariate analysis. Field cultivation.

1 INTRODUÇÃO

Digitalis mariana ssp. *heywoodii* P. Silva & M. Silva pertence à família Plantaginaceae, endêmica do Sudeste de Portugal (Alto Alentejo) e regiões adjacentes da Espanha (Badajoz, Cordoba, Jaén - Província Luso-Extremadurensis, Setor Mariânico-Monchiquense) (NAVARRO *et al.*, 2000).

A presença de 0,3% a 0,5% (p/p) de cardenolídeos já foi descrita, para essa espécie (CLEMENTE *et al.*, 2011; LUCKNER; WICHTL, 2000), e estudos farmacológicos têm demonstrado associação cardiovascular inotrópica positiva (NAVARRO *et al.*, 2000) e atividade antitumoral (LÓPEZ-LÁZARO *et al.*, 2003). Glucoevatromonosídeo (GEV). O cardenolídeo predominante na planta é ativo contra o vírus do herpes humano (BERTOL *et al.*, 2011). Pelo interesse comercial no gênero *Digitalis*, estudos focaram na cultura e propagação *in vitro* de várias espécies de *Digitalis* (DURAN; KEYFLI, 2021; GUREL *et al.*, 2011; KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015; NARTOP; ALTAN; TITREK, 2021; PÉREZ-ALONSO *et al.*, 2009, 2018; RAD *et al.*, 2021; VERMA *et al.*, 2016; YÜCESAN *et al.*, 2014) e deixaram de lado seu cultivo em campo.

Mais de 80 cardenolídeos, estruturalmente diferentes, já foram isolados e relatados estarem presentes nas folhas e sementes de *Digitalis* ssp. e seus teores variam com a influência de fatores bióticos e abióticos, incluindo o local de coleta, período de desenvolvimento (idade) da planta, macro e micronutrientes, além de diversos outros fatores macro e micro ambientais (ATKINSON *et al.*, 2012; GANAPATY *et al.*, 2003; KREIS, 2017; KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015; OH *et al.*, 2005).

A maior parte dos processos fisiológicos e morfológicos das espécies depende da luz. Essas funções ocorrem na faixa do espectro denominado luz visível, que se encontra entre 400 e 700 nm, sendo esse intervalo a principal fonte de energia para a fotossíntese. Cerca de 85% a 90% da radiação fotossinteticamente ativa é absorvida pelos pigmentos primários, especialmente, nas regiões do azul e do vermelho (LIMA *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2019).

As malhas coloridas são técnicas de manipulação da qualidade da luz e representam um novo conceito agrotecnológico, que se destina a combinar a proteção física com a filtração diferencial da radiação solar, para favorecer as respostas fisiológicas que são reguladas pela luz (SHAHAK; GUSSAKOVSKY, 2004). Essas telas, obtidas comercialmente, têm demonstrado proporcionar respostas de crescimento e produção de metabólitos secundários variados, conforme a espécie vegetal medicinal (AMARAL, 2007; CENTOFANTE *et al.*, 2020;

HENRIQUE *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; OREN-SHAMIR *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2011a).

Desta forma, estudos que investigam esta temática, como a influência da qualidade da luz no desenvolvimento da espécie e produção de cardenólídeos (VERMA *et al.*, 2018), são importantes, principalmente, quando seus dados permanecem escassos na literatura a qual corre risco de extinção no seu local de origem.

Diante do exposto e da necessidade de informações, a respeito do cultivo em campo de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, para a maximização dos teores de cardenólídeos totais e GEV, objetivou-se avaliar os aspectos morfofisiológicos de crescimento sob o efeito da qualidade espectral da luz transmitida pelas malhas fotoconversoras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal para estudos de desenvolvimento e validação analítica

Inicialmente foram preparadas mudas a partir de sementes de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* adquiridas comercialmente (Jelitto Seeds®, Alemanha). Foram germinadas, em bandejas de poliestireno expandido com 128 células, em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, situada nas coordenadas geográficas 21°14'S 00W, a 918m de altitude, com umidade relativa de 95% e temperatura média de 26 ± 2 °C, em substrato comercial até as plântulas atingirem dois pares de folhas plenamente desenvolvidas (10 - 15 cm).

Em seguida, as mudas foram transplantadas para vasos de plástico com capacidade de 8 litros contendo a mistura de solo + areia (2:1) e 9 kg m^{-2} de adubação orgânica, sendo ela esterco de galinha curtido ($4,5 \text{ kg m}^{-2}$) e esterco bovino curtido ($4,5 \text{ kg m}^{-2}$). O solo empregado ao desenvolvimento das mudas foi classificado como latossolo vermelho distrófico (LVd) de horizonte B com textura argilosa. Uma amostra do solo foi coletada na camada de 0 a 0,20 m de profundidade, sob vegetação natural não antropizada, livre de adubação com fertilizantes ou agroquímicos pelo menos, nos últimos cinco anos, dentro do campo experimental do Horto de Plantas Medicinais na Universidade Federal de Lavras-MG. Essas amostras foram destorroadas, secas ao ar e passadas em peneira com malha de 5 mm de abertura. Posteriormente a amostra de solo foi peneirada, em peneira de 2 mm de abertura, para a realização da caracterização química da fração terra fina seca ao ar (TFSA) (TABELA 1).

Tabela 1 - Características químicas de amostras dos solos utilizados (camada de 0 a 0,2 m de profundidade). Lavras, MG, 2021.

(Continua)

Características*	LVd
pH (H ₂ O)	6
P mehlich (mg/dm ⁻³)	1,71
P-rem (mg/dm ⁻³)	19,58
K (mg dm ⁻³)	22
Ca (cmol _c dm ⁻³)	0,50
Mg (cmol _c dm ⁻³)	0,07
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,60
H + Al (cmol _c dm ⁻³)	7,04

Tabela 1 - Características químicas de amostras dos solos utilizados (camada de 0 a 0,2 m de profundidade). Lavras, MG, 2021.

(Conclusão)

Características*	LVd
SB (cmol _c dm ⁻³)	0,69
C orgânico	0,88
V(%)	9,01
t (cmol _c dm ⁻³)	1,30
T (cmol _c dm ⁻³)	7,74
m (%)	46,15
S (mg dm ⁻³)	15,21
Zn (mg dm ⁻³)	1,46
B (mg dm ⁻³)	0,28
Fe (mg dm ⁻³)	119,20
Mn (mg dm ⁻³)	11,56
Cu (mg dm ⁻³)	1,98

Fonte: Da autora (2021).

*Análises realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo do Departamento de Ciência do Solo da UFLA.

O controle de plantas invasoras foi realizado manualmente e com turno de rega realizado de três em três dias com volume de 1,5 L de água por vaso. Durante o experimento, não foi verificada infecção por patógenos e ou ataques de pragas.

Após 120 dias, amostras das folhas de *D. mariana* ssp. *heywoodii* foram coletadas e secas em estufa de circulação forçada de ar a 70°C (para a destruição da enzima digipurpuridase), durante 24 horas, para o preparo do extrato. Após a secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas (MARCONI® MA0048), pesado em aliquotas (125 mg) e congelados em saquinhos de plástico (7x12 cm) sob a temperatura de 4° C, para os estudos de desenvolvimento e validação analítica por CLAE/DAD e quantificação de GEV.

2.2 Otimização extrativa

O processo extrativo foi realizado, a partir do método de extração assistida por ultrassom, uma vez que constitui um método simples, econômico e com baixo consumo de solvente orgânico. A otimização do processo de extração envolveu três etapas de planejamento experimental: 1) Planejamento simplex-centroide; 2) Planejamento Fatorial Completo e 3) Planejamento Composto Central. Os dados obtidos por essas análises foram tratados e processados, utilizando-se um método de regressão multivariada, que propõe modelos empíricos para explicar e executar o ajuste fino (otimização) dos parâmetros experimentais importantes (PEREIRA-FILHO, 2015).

A resposta analítica foi monitorada para a condução dos planejamentos experimentais à avaliação da área do pico cromatográfico de GEV.

2.2.1 Planejamento simplex-centroide

A fim de definir a melhor proporção de solvente para a máxima extração de GEV em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, foi realizado um planejamento experimental de misturas usando o planejamento simples-centroide. Para isso, três solventes com polaridades distintas: metanol, etanol e água foram empregados de forma isolada, em composição binária ou trinária, conforme a detalhado na Tabela 2. Os extratos foram preparados em quintuplicata.

Tabela 2 - Matriz experimental codificada do planejamento das misturas de extração para *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. Lavras, MG, 2021.

Extrato	Solventes (mL)		
	Metanol	Etanol	Água
1	0,33	0,33	0,33
2	1	0	0
3	0,5	0,5	0
4	0	1	0
5	0	0,5	0,5
6	0	0	1
7	0,5	0	0,5

Fonte: Da autora (2021).

A extração de GEV seguiu o protocolo proposto por Kreis, Haug e Yücesan (2015), com modificações. Para análise do melhor solvente a ser utilizado, foram analisadas as áreas correspondentes aos picos de GEV nos cromatogramas (resposta analítica para realização do planejamento), empregando-se o Sisvar com o teste de Scott-Knott a 5%.

Após a secagem e moagem das folhas, uma massa de 100 mg foi utilizada, para as extrações, com a proporção dos solventes selecionados (TABELA 2) a 70 °C por sonicação, empregado-se 1 ciclo ininterrupto de 30 min. Após esse período, o extrato foi colocado em gelo por 5 min e, então, foi microcentrifugado a 13000 g por 10 min. Logo depois, foram adicionados ao sobrenadante 300 µL de acetato de chumbo a 15% (p/v) e utilizado o vórtex por 3 segundos, o qual foi incubado por 5 min em temperatura ambiente (25°C). Depois desse período, as amostras foram novamente microcentrifugadas. Uma vez removido o precipitado, 200 µL de solução aquosa de fosfato monossódico (Na₂HPO₂) a 10% (p/v) foram adicionados ao sobrenadante e, em seguida, foi microcentrifugado. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 5 mL e a ele foi adicionado 1 mL de clorofórmio:isopropanol (3:2 v/v) e utilizado

o vórtex por 3 segundos, em seguida, centrifugado a 13000 g durante 5 min. A fase inferior foi transferida para um balão e, então, rotaevaporada até *secura*. O preparo da amostra foi realizado conforme o item 2.2.5.

A codificação dos níveis das variáveis, avaliação da significância das variáveis testadas e capacidade preditiva dos modelos gerados foram realizadas nos *softwares* Microsoft® Excel (Microsoft® Office, EUA) e software *Statística 7*, empregando-se ANOVA. Teste F e T.

2.2.2 Planejamento Fatorial Completo: seleção dos parâmetros extrativos

Foi realizada uma triagem dos fatores com o objetivo de verificar qual deles possui maior impacto na resposta extrativa e a fim de eliminar fatores sem importância ao processo, antes de investir no ajuste fino dos resultados (PCC). Desta forma, foi aplicado um método de regressão multivariada denominado Planejamento Fatorial Completo (BRERETON, 2002; PEREIRA-FILHO, 2015).

Tabela 3 - Planejamento fatorial completo 2^4 com o total de ensaios e os fatores X_1 , X_2 , X_3 e X_4 codificados em níveis +1 e -1. Lavras, MG, 2020.

Extrato	Variáveis Codificadas				Variáveis não codificadas			
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1 (mg mL ⁻¹)	X_2 (min)	X_3 (°C)	X_4
1	-1	-1	-1	-1	20	5	25	1
2	1	-1	-1	-1	100	5	25	1
3	-1	1	-1	-1	20	30	25	1
4	1	1	-1	-1	100	30	25	1
5	-1	-1	1	-1	20	5	70	1
6	1	-1	1	-1	100	5	70	1
7	-1	1	1	-1	20	30	70	1
8	1	1	1	-1	100	30	70	1
9	-1	-1	-1	1	20	5	25	3
10	1	-1	-1	1	100	5	25	3
11	-1	1	-1	1	20	30	25	3
12	1	1	-1	1	100	30	25	3
13	-1	-1	1	1	20	5	70	3
14	1	-1	1	1	100	5	70	3
15	-1	1	1	1	20	30	70	3
16	1	1	1	1	100	30	70	3

Fonte: Da autora (2021).

Nessa segunda etapa, quatro variáveis do processo extrativo foram avaliadas em dois níveis alto (+1) e baixo (-1): razão-droga-vegetal por solvente extrator (X_1 , mg mL⁻¹), tempo de

maceração assistida por ultrassom (X_2 , min.), temperatura do banho de ultrassom (X_3 , °C) e número de ciclos de extração (X_4), para determinar quais delas efetivamente apresentavam efeito sobre a quantidade extraída de GEV de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. Foram realizados 16 experimentos (2^n , sendo n o número de variáveis), variando os níveis (alto e baixo) de cada variável (TABELA 3) (BRERETON, 2002; PEREIRA-FILHO, 2015). Todos os 16 experimentos de extração foram realizados em quadruplicata. As análises qualitativas e quantitativas de GEV.

2.2.3 Planejamento Composto Central (PCC): ajuste fino dos parâmetros selecionados

Após a identificação das interações das variáveis de melhor significância estatística, realizou-se neles um ajuste fino pela metodologia de superfície de resposta (MSR), utilizando PCC, para estabelecer a região experimental e definir os experimentos a serem realizados, variando os parâmetros em cinco níveis (TABELA 4) (BRERETON, 2002; PEREIRA-FILHO, 2015). As condições ótimas, para a realização da extração foram definidas monitorando exclusivamente as áreas relativas do pico cromatográfico correspondente ao GEV nas análises por CLAE-DAD.

A codificação dos níveis das variáveis, avaliação da significância das variáveis testadas e capacidade preditiva dos modelos gerados foram realizadas, utilizando-se os *softwares* Microsoft® Excel (Microsoft® Office, EUA) e Statística 7, empregando-se uma ANOVA. Para determinar as condições ótimas, foi gerada a superfície de resposta (e gráfico de contorno), relacionando as variáveis testadas e o modelo proposto para cada resposta monitorada.

Tabela 4 - Planejamento composto central e os fatores X_1 , X_2 e X_3 codificados em cinco níveis -1, -1,68, 0, 1 e 1,68 e sem codificações. Lavras, MG, 2021.

(Continua)

Extrato	Variáveis Codificadas			Variáveis não codificadas		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1	0,036	10	2
2	1	-1	-1	0,101	10	2
3	-1	1	-1	0,036	24	2
4	1	1	-1	0,101	24	2
5	-1	-1	1	0,036	10	4
6	1	-1	1	0,101	10	4
7	-1	1	1	0,036	24	4
8	1	1	1	0,101	24	4
9	-1,68	0	0	0,015	19	3
10	1,68	0	0	0,125	19	3
11	0	-1,68	0	0,07	7	3

Tabela 4 - Planejamento composto central e os fatores X_1 , X_2 e X_3 codificados em cinco níveis -1, -1,68, 0, 1 e 1,68 e sem codificações. Lavras, MG, 2021.

(Conclusão)

Extrato	Variáveis Codificadas			Variáveis não codificadas		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
12	0	1,68	0	0,07	31	3
13	0	0	-1,68	0,07	19	1
14	0	0	1,68	0,07	19	5
15	0	0	0	0,07	19	3
16	0	0	0	0,07	19	3
17	0	0	0	0,07	19	3
18	0	0	0	0,07	19	3
19	0	0	0	0,07	19	3

Fonte: Da autora (2021).

2.2.4 Análises dos perfis cromatográficos por CLAE-FR

Os perfis cromatográficos por CLAE-FR (cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa) foram obtidos, a fim de avaliar a complexidade e a polaridade dos constituintes presentes nas amostras, assim como para identificar a presença e estimar o teor de GEV. As análises qualitativas foram realizadas, a partir da comparação dos tempos de retenção, espectros no UV e coinjeção com substância de referência.

2.2.5 Preparo dos extratos

A metodologia extrativa, utilizada neste trabalho, foi validada anteriormente (item 2.6.3.1). A massa de 125 mg de folhas secas pulverizadas foram extraídas com a mistura trinária de 0,333 μ L de metanol, 0,333 μ L de etanol e 0,333 μ L de água. A extração foi realizada por 1 ciclo de 31 minutos de maceração assistida por ultrassom em temperatura ambiente. O extrato foi microcentrifugado a 13000 g por 10 min. Após, foram adicionados ao sobrenadante 300 μ L de acetato de chumbo a 15% (p/v) e homegeinizado por vórtex por 3 segundos, no qual foi mantido por 5 min em temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, as amostras foram novamente microcentrifugadas. Uma vez removido o precipitado, 200 μ L de solução aquosa de fosfato monossódico (Na_2HPO_2) a 10% (p/v) foram adicionados ao sobrenadante, homogeneizado por vórtex e, depois, foi microcentrifugado. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 5 mL e a ele foi adicionado 1 mL de clorofórmio:isopropanol (3:2 v/v) e centrifugado a 13000 g durante 5 min. A fase inferior foi transferida para um balão e, então, rotaevaporada até *secura*.

2.2.6 Preparo das amostras

Após a obtenção dos extratos (item 2.2.5), eles foram solubilizados em 1.000 µL de metanol (MeOH) grau CLAE, seguido de sonicação até dissolução completa (1 a 2 min), seguido de centrifugação a 8.400 g, por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para vials e analisados por CLAE.

2.2.7 Equipamento e condições cromatográficas para a obtenção dos perfis exploratórios

Os perfis cromatográficos exploratórios foram obtidos para as amostras de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, empregando-se um sistema de cromatografia líquida Agilent 1200 Series (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha), equipado com bomba quaternária (G1311A), sistema de degasificação (G13222A), amostrador automático ALS (G1322A) e detector de arranjo de diodos (G1315D), com detector ultravioleta de comprimento de onda variável (G1315D), conectado ao computador com sistema controlado pelo *software* EzChrom, versão OpenLAB. As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa Eclipse XDB-C18 (5 µm × 150 mm × 4,6 mm I.D.) (Agilent Technologies®, EUA), com pré-coluna, fluxo de 1 mL/min, empregando gradiente linear descrito na Tabela 5. As análises foram realizadas a 40 °C, com detecção no comprimento de onda de 210 nm, pressão do sistema de 400 bar, volume de injeção de 10 µL. Espectros no UV, na faixa de 205 a 400 nm, foram registrados *on-line* para cada pico.

Tabela 5 - Gradiente linear de eluição empregado para o registro dos perfis cromatográficos exploratórios por CLAE-DAD. Lavras, MG, 2021.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
65	5	95
70	5	95
75	95	5
85	95	5

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: A= água. C = acetonitrila. Ambos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico.

2.3 Desenvolvimento das condições cromatográficas

Por cauda da condição cromatográfica exploratória ter um tempo longo de análise, para o desenvolvimento da condição cromatográfica à quantificação de glicoevatromonosídeo (GEV), em folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, empregou-se a condição descrita por Kreis, Haug e Yücesan (2015).

A partir da condição de Kreis, Haug e Yücesan (2015), foram realizados ajustes finos, nas condições de fluxo, força do modificador orgânico e inclinação do gradiente. As condições avaliadas estão apresentadas na Tabela 6.

A identificação do pico correspondente ao GEV no cromatograma e, em cada condição cromatográfica, foi feita pela coinjeção com substância de referência. A seletividade do método foi avaliada pela homogeneidade espectral dos picos, no comprimento de onda de 210 e 230 nm. Essa análise foi realizada pela sobreposição dos espectros registrados nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos, sendo considerado seletivo, quando apresentou pureza espectral acima de 99 %. A eficiência da condição cromatográfica estabelecida também foi avaliada pela determinação de parâmetros de adequação do sistema (*system suitability test*), compreendendo a determinação da resolução, fator de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e DPR dos tempos de retenção para o pico do GEV. Os resultados foram comparados com os limites recomendados por Bose *et al.* (2014). Para estabelecer o tempo morto (t_0) da corrida cromatográfica, foram injetados no sistema, nas mesmas condições de análise, 10 µL de solução de nitrito de sódio 0,01% (p/v).

Tabela 6 - Condições cromatográficas avaliadas, durante o desenvolvimento do método por CLAE-DAD, para a análise de GEV nas folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. Lavras, MG, 2021.

(Continua)

Condição experimental A (KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015)			
Tempo (min)	Eluente (%)		Temp. (°C)
	A	C	
0,1	96	4	
5	95	5	
35	58	42	
40	50	50	
55	40	60	40
60	40	60	
62	4	96	
72	4	96	
75	30	30	
78	4	4	

Tabela 6 - Condições cromatográficas avaliadas, durante o desenvolvimento do método por CLAE-DAD, para a análise de GEV nas folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. Lavras, MG, 2021.

			(Conclusão)
Condição experimental B			
0,1	96	4	
5	95	5	
35	58	42	
40	50	50	
55	40	60	40
60	40	60	
62	4	96	
72	4	96	
75	30	30	
78	4	4	
Condição experimental C			
0	95	5	
35	58	42	
45	40	60	
48	5	95	
53	5	95	40
58	95	5	
65	95	5	
Condição experimental D (Condição estabelecida)			
0	95	5	
35	58	42	
45	40	60	
48	5	95	
53	5	95	40
58	95	5	
65	95	5	

Fonte: Da autora (2021).

Legenda: Eluentes: A: Água; C: Acetonitrila. Todos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico. **Nota:** eluição das condições experimentais A e D realizadas com fluxo 1,5 mL min⁻¹. Eluição das condições experimentais B e C realizadas com fluxo 1,2 mL min⁻¹. Detecção realizada a 230 nm.

2.4 Identificação de glicoevatromonósídeo (GEV) nos extratos de *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* (P. Silva and M. Silva) Hinz por técnicas cromatográficas hifenadas

A identificação de GEV, nos extratos de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, foi realizada pela análise por técnica cromatográfica hifenada, a saber, cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a detector de arranjo de diodos em interface com espectrômetro de massas com analisador tipo triplo quadrupolo (CLUE-DAD-EM). Os extratos foram preparados da mesma forma descrita para as análises de CLAE-FR (itens 2.2.5 e 2.2.6).

2.5 Análises cromatográficas por CLUE-DAD-EM

O perfil fitoquímico do extrato de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* foi avaliado, empregando-se sistema de cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE) (Waters), acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD: 200-500 nm), em interface com espectrômetro de massas com analisador triplo quádrupolo (EM-TQD) (Waters Micromass). Para tanto, empregou-se uma coluna de fase reversa (Acquity UPLC BEH C18, Waters; 50 × 2,1 mm d.i. 1,7 µm), em combinação com uma pré-coluna (Acquity UPLC BEH C18 VanGuard pre-column, Waters; 2,1 × 5 mm d.i. 1,7 µm), utilizando-se eluição em gradiente de água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. Empregou-se o gradiente de eluição a seguir (TABELA 7). O fluxo utilizado foi de 0,3 mL/min, com volume de injeção de 7,0 µL, mantendo-se a temperatura da coluna em 40 °C.

Tabela 7 - Gradiente de eluição estabelecido para a identificação de GEV nos extratos de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.

Tempo (min)	%A*	%B*
0	95	5
24	40	60
26	5	95
27	95	5
30	95	5

Fonte: Da autora (2021).

***Solvente A:** água acidificada com 0,1% de ácido fórmico;

***Solvente B:** acetonitrila grau CLAE acidificada com 0,1% de ácido fórmico.

As análises foram realizadas, em um espectrômetro de massas *Xeco Triple Quadrupole MS* (Waters), com fonte de ionização por *electrospray* (ESI), monitorando os modos negativo e positivo no modo *Scan*, operando nas seguintes condições: voltagem do capilar de 3,5 kV; temperatura da fonte de 120 °C; temperatura de dessolvatação 350 °C; fluxo do gás do cone 50 L/h e fluxo do gás de dessolvatação em 600 L/h (TABELA 8). O intervalo de massas avaliado foi de *m/z* 20 a 1974 Da.

A investigação dos fragmentos filho foi realizada com energia de colisão em rampa: 15-70 V com um período de *scan* de 0,5 seg.

Procedeu-se à identificação de GEV, a partir da comparação das análises dos perfis espectrais, obtidos pelo padrão de GEV e de quatro extratos de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.

Tabela 8 - Condições espectroscópicas definidas para a análise do perfil fitoquímico dos extratos.

Condições espectroscópicas de detecção no modo ESI- e ESI +	
Voltagens	
Capilaridade(kV)	3,5
Cone (V)	Gradiente 20-70
Extrator (V)	3
RF Lens (V)	0,1
Temperatura	
Temperatura de dessolvatação (°C)	350
Temperatura na fonte (°C)	120
Fluxo de gases	
Gás de dessolvatação (L/h)	600
Cone (L/h)	50
Analisador	
Resolução de massas baixas 1	15
Resolução de massas altas 1	15
Ion energy	0.50
Entrada	1
Saída	50
Energia de colisão (V)	10
Resolução de massas baixas 2	15
Resolução de massas altas 2	15
Ion energy 2	0.50
Ganho	1
Espectroscopia na região do ultravioleta	
Faixa de varredura (nm)	290 - 500
Condições de injeção	
Volume de injeção	7,0 µL
Fluxo	0,3 mL/ min

Fonte: Da autora (2021).

As amostras foram injetadas na concentração de 10 mg/mL, obtidas pela solubilização de 10 mg de cada extrato em 1,0 mL de metanol grau CLAE, realizada diretamente em tubos plásticos tipo *safe-lock*. A suspensão foi mantida, em banho de ultrassom, centrifugada a 8.400 × g, ambos a 10 min, e os sobrenadantes foram filtrados em membrana de PVDF (0,22 µm) e injetados, automaticamente, no sistema de cromatografia descrito.

2.6 Validação do método analítico por CLAE-DAD

2.6.1 Preparo de amostras

Os extratos das folhas secas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* foram obtidos conforme descrito no item 2.2.5. Alíquotas de 10 µL dos extratos das folhas foram injetadas automaticamente no CLAE.

2.6.2 Preparo das soluções de referências

A solução de referência de GEV foi solubilizada em metanol grau CLAE a 1,0 mg mL⁻¹ e 10 µL foram injetadas no cromatógrafo.

2.6.3 Validação analítica

O método desenvolvido no item 2.6.3.1 foi validado em concordância com a *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use* (ICH, 1996) e com a Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017), empregando-se mistura trinária equivolúmica dos solventes etanol, metanol e água para a extração de GEV de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. Para validação, foram respeitados os parâmetros de seletividade; linearidade, exatidão, precisão; limite de quantificação (LQ); limite de detecção (LD) e robustez, em concordância com as recomendações das instituições nacionais (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2007) e internacionais (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2000; ICH, 1996).

As análises estatísticas foram feitas nos programas Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation 2010), SISVAR (FERREIRA, 2019) e GraphPad Prism, versão 8.0.1 (GraphPad Software, 2017).

2.6.3.1 Parâmetros utilizados na condição cromatográfica estabelecida

Os parâmetros utilizados para a condição cromatográfica estabelecida para quantificação de GEV em extrato de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros utilizados para a condição cromatográfica por CLAE-DAD estabelecida, para a quantificação de GEV, em extrato de *Digitalis mariana ssp. heywoodii*. Lavras, MG, 2021.

Parâmetro	Condição
Coluna	Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm d.i. 5 µm)
Pré-coluna	Eclipse XDB-C18 (4,6 mm × 12,5 mm d.i. 5 µm)
Temperatura da coluna	40 °C
Fluxo	1,5 mL/min
Comprimento de onda de detecção	230 nm
Pressão do sistema	400 bar
Fase móvel	Solução A (água ultrapura) Solução C (acetonitrila grau CLAE), ambas contendo 0,1% de ácido fosfórico, conforme descrito na Tabela 9
Volume de injeção	10 µL

Fonte: Da autora (2021).

Na Tabela 10, é apresentado o programa de eluição estabelecido, para a quantificação de GEV, em extrato de *Digitalis mariana ssp. heywoodii*.

Tabela 10 - Programa de eluição estabelecido, para a quantificação de GEV, em extrato de *Digitalis mariana ssp. heywoodii*. Lavras, MG, 2021.

Tempo (min)	A (%)	C (%)	Modo de eluição
0	95	5	gradiente linear
35	58	42	gradiente linear
45	40	60	gradiente linear
48	5	95	isocrático
53	5	95	isocrático
10	95	5	gradiente linear
65	95	5	isocrático

Fonte: Da autora (2021).

2.6.3.2 Teste de Adequabilidade do Sistema

Os parâmetros de adequabilidade do sistema (*system suitability test*) foram realizados para assegurar o desempenho cromatográfico. Foram avaliados os seguintes parâmetros: resolução, número de pratos teóricos (N), desvio-padrão relativo do tempo de retenção (DPR), assimetria (α), fator de retenção (R). Os dados foram obtidos pelo *System Suitability* do programa Ezchrom, de acordo com a *The United States Pharmacopoeia* (USP, 2006), sendo os resultados expressos como valor médio de seis determinações ($n=6$), os quais foram comparados com os limites recomendados por Bose (2014). Para se estabelecer o tempo morto (t_0) da corrida

cromatográfica, injetou-se no sistema, nas mesmas condições da análise, 10 µL de solução de nitrito de sódio 0,01% (p/v), em metanol grau CLAE, mesmo solvente empregado na solubilização das amostras.

2.6.3.3 Estabilidade Química

A estabilidade química do extrato de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* foi avaliada, mantendo o vial contendo a amostra no carrossel do HPLC, com todas as soluções mantidas à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), sendo analisadas sequencialmente nos intervalos de 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 e 42 horas, realizando seis injeções do extrato para cada tempo. As médias das áreas, em cada intervalo de tempo, foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e o DPR ($\leq 2\%$) das seis injeções também foi calculado.

2.6.3.4 Seletividade

De modo a confirmar a seletividade do método, para a validação analítica de GEV, foram injetadas as seguintes soluções: solução padrão de referência e seis amostras do extrato de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.

A seletividade do método foi avaliada, por meio da comparação do cromatograma do extrato de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* preparado, conforme o método extrativo otimizado com o padrão de referência de GEV. Essa foi feita pela homogeneidade espectral dos picos a 230 nm e sobreposição de espectros registrados nas suas regiões ascendente, apical e descendente, simultaneamente, na mesma condição cromatográfica. Além da realização do cálculo de pureza espectral pelo *software* EZChrom, considerou-se o pico puro, quando houve uma exata sobreposição.

2.6.3.5 Linearidade

A linearidade foi determinada, a partir da obtenção de três curvas analíticas da solução de referência, cada uma em cinco concentrações, no intervalo de 0,2 a 1,5 µg mL⁻¹, como indicado na Tabela 11. O preparo e análise das soluções foram feitos em três dias consecutivos e cada ponto das curvas foi obtido por injeção em triplicata.

Tabela 11 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas, para a construção da curva analítica, conforme a concentração da solução de referência. Lavras, MG, 2021.

Volume (μL)	Massa (μg)
Solução de referência $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$	
30	1,5
20	1
12	0,6
8	0,4
4	0,2

Fonte: Da autora (2021).

As médias das áreas dos picos dos cromatogramas foram plotadas, em função das respectivas concentrações de trabalho, para a obtenção das curvas analíticas. Os dados obtidos, para cada curva de calibração, foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (R^2) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos três dias consecutivos foram determinadas em relação à massa injetada e comparadas estatisticamente por análise de covariância ($p < 0,05$) no *software* GraphPad Prism 6.

2.6.3.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi inicialmente estimado a partir da equação que emprega os parâmetros da curva analítica:

$$\text{LQ} = 10 \text{ s/S}$$

Em que LQ = limite de quantificação;

s: desvio-padrão do intercepto da curva de regressão;

S= inclinação da curva analítica.

A partir dos valores encontrados pela equação, o limite de quantificação foi determinado pela injeção em quintuplicata de massas decrescentes de GEV ($0,1$ a $0,04 \mu\text{g}$), obtidas por ajustes no volume de injeção (TABELA 12). O limite de quantificação foi determinado a partir da menor área dos picos que apresentaram precisão com $\text{DPR} \leq 3,0\%$.

Tabela 12 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas da solução de referência para a determinação dos limites de quantificação de GEV.

Concentração da solução estoque ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume de injeção (μL)	Massa injetada (μg)
10	10	0,1
10	5	0,05
10	4	0,04

Fonte: Da autora (2021).

2.6.3.7 Limite de detecção

A estimativa do limite de detecção foi realizada, a partir dos dados da curva analítica, utilizando-se a seguinte equação:

$$LD = 3,3 s/S$$

em que: LD = limite de detecção;

s = desvio-padrão do intercepto da curva de regressão;

S=inclinação da curva analítica.

O limite de detecção também foi determinado pela injeção, em quintuplicata, de massas decrescentes de GEV (0,05 a 0,04 μg), obtidas por ajustes no volume de injeção (TABELA 11). Foi estabelecido como a menor a massa injetada detectável, que proporcionou altura do pico do analito com ao relação sinal-ruído (S/N) de 2:1 (BRASIL, 2017). Os valores de sinal-ruído (S/N) de cada pico foram gerados pelo *software* OpenLab Ezchrom®. Na Tabela 13, a seguir, está descrita a correspondência entre os volumes e as massas injetadas da solução de referência para a determinação dos limites de quantificação e detecção de GEV.

Tabela 13 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas da solução de referência para a determinação dos limites de quantificação e detecção de GEV.

Concentração da solução estoque ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume de injeção (μL)	Massa injetada (μg)
10	5	0,05
10	4	0,04

Fonte: Da autora (2021).

2.6.3.8 Precisão

A precisão do método cromatográfico foi demonstrada pela repetibilidade, pela qual se analisou amostras do extrato de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, preparadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e com a utilização da mesma instrumentação em um único dia. Para a precisão intermediária, as amostras do extrato foram analisadas em dias diferentes e por um analista diferente, mas sobre as mesmas condições de operação utilizadas na repetibilidade, as quais foram verificadas por meio de seis determinações a 100% da concentração do extrato.

Esses experimentos foram realizados com intervalo de três dias e, em cada um deles, foi determinado o desvio-padrão relativo (DPR) das médias das áreas para as seis determinações.

2.6.3.9 Exatidão

Os testes de recuperação foram realizados pela fortificação da amostra de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* com quantidade conhecida da substância de referência. Esse parâmetro foi determinado somente a partir do nível mínimo de concentração, que foi avaliado com três réplicas, em razão da pouca quantidade de GEV disponível para esse ensaio. Foi preparada solução metanólica de GEV, na concentração de $10,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TABELA 14).

O volume de $10 \mu\text{L}$ da solução, contendo massa conhecida de GEV, foi adicionado diretamente às folhas secas e pulverizadas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, antes do início do processo de extração. Para o início da extração, esperou-se a secagem ao ar da solução adicionada. Após a fortificação, as amostras foram preparadas e analisadas. Amostras do extrato hidroalcoólico não fortificadas ($n=3$) também foram preparadas para a determinação da massa recuperada. A recuperação foi determinada, empregando-se a seguinte equação: % Recuperação = massa experimental/massa teórica*100.

Tabela 14 – Correspondência entre o volume e a massa da solução de referência de GEV adicionada às folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* na determinação da exatidão de GEV. Lavras, 2021.

Concentração da solução de GEV ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nível	Volume de solução de GEV adicionado às folhas (μL)	Massa de padrão adicionada às folhas (μg)
10,8	1	10	0,108

Fonte: Da autora (2021).

2.6.3.10 Robustez

Para avaliar a robustez, as amostras em sextuplicatas foram submetidas a injeções, em que se variaram, discretamente, os parâmetros cromatográficos de fluxo e temperatura da coluna no sistema, estabelecendo um nível inferior (-) e outro superior (+) à condição cromatográfica estabelecida, descrito na Tabela 15.

Tabela 15 - Níveis de variação dos parâmetros cromatográficos na robustez do método por CLAE-FR. Lavras, MG, 2021.

Parâmetro Cromatográfico	Varição (-)	Condição Cromatográfica	Varição (+)
Fluxo (mL/min)	1,4	1,5	1,6
Temperatura da Coluna ($^{\circ}\text{C}$)	39	40	41

Fonte: Da autora (2021).

Para avaliar a influência desses parâmetros sobre o método, foi determinado o desvio-padrão relativo (DPR) entre os tempos de retenção dos picos, os parâmetros de adequabilidade do sistema (*system suitability test*), resolução, número de pratos teóricos (N), assimetria (α), fator de retenção (R). Os parâmetros modificados foram avaliados individualmente.

2.7 Análises estatísticas

Os dados da otimização extrativa foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Diferenças entre os grupos avaliados foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ de acordo com o teste de Scott-Knott. As análises estatísticas da validação do método foram feitas nos programas Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation, 2003), SISVAR (FERREIRA, 2019) e GraphPad Prism[®] versão 6.0 (Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA).

2.8 Cultivo de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* sob malhas fotoconversoras e obtenção das mudas

O experimento foi conduzido na área experimental pertencente ao Horto Medicinal da Universidade Federal de Lavras (UFLA - MG), situado nas coordenadas geográficas 21° 14'S 00 W, a 918m de altitude, localizada no município de Lavras/MG. Foram utilizadas mudas obtidas de sementes adquiridas comercialmente (Jelitto Seeds®, Alemanha).

Os tratamentos foram caracterizados pelo cultivo das plantas sob disponibilidade de radiação solar incidente e qualidade espectral: pleno sol (0% de sombreamento) e malhas fotoconversoras com 50% de transmitância na cor preta, azul e vermelha. A estrutura de sombreamento sobre as plantas foi presa a uma estrutura de madeira removível de 1,80 m de altura por 3,15 m de largura por 2,60 de comprimento.

Os vasos foram dispostos, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), entre quatro tratamentos, cada um composto de 20 vasos (1 planta vaso⁻¹), totalizando 80 plantas, com espaçamento entre vasos de aproximadamente 40 cm. A partir da instalação do experimento, as mudas foram acompanhadas diariamente recebendo os tratos culturais (rega, retirada de plantas invasoras e controle de pragas).

Após 120 dias, as plantas de cada tratamento foram separadas em folhas e raízes e todo o material foi seco em estufa com circulação forçada de ar a $70 \pm 2^\circ\text{C}$, utilizando-se balança analítica de precisão (BL 3200H - Shimadzu®) e avaliadas em relação a parâmetros de crescimento vegetal, quantificação de pigmentos fotossintetizantes, análise quantitativa de cardenólídeos totais, GEV e proteínas solúveis, buscando identificar qual cor de tela fotoconversora era capaz de melhorar os parâmetros avaliados.

2.9 Determinação do crescimento vegetal

Ao final dos 120 dias após o transplântio das mudas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento e largura das folhas (cm), área foliar (cm²) mensurada por meio do *software* WinFOLIATM e scanner EPSON PERFECTION V700 PHOTO, comprimento do sistema radicular (cm), medidos com o auxílio de fita métrica; número de folhas por vaso; matéria seca de folha (g planta⁻¹) e do sistema radicular (g planta⁻¹). O material coletado foi armazenado, em sacos de papel pardo, identificados individualmente e seco em estufa de circulação de ar forçada (320 SE - FANEN®), reguladas com a temperatura

de 70 °C, por 24h, momento no qual obteve-se peso constante. Após a secagem, o material foi pesado em balança analítica, determinando sua matéria seca.

2.10 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes

A determinação dos teores dos pigmentos fotossintetizantes foi realizada com material foliar fresco no final dos 120 dias de condução do experimento. Foram coletadas três pares de folhas completamente expandidas do terceiro nó superior de três plantas de cada tratamento, tomadas ao acaso, no período entre 7h e 7h30 da manhã. As folhas coletadas foram embrulhadas em papel alumínio e acondicionadas em uma caixa de isopor, contendo gelo até a transferência ao Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA.

Os procedimentos adotados, para a extração e análise das clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides, foram realizados, conforme a metodologia de Hiscox e Israelstam (1979) com adaptações propostas por Banes *et al.* (1992). Foram utilizados 50 mg de folhas frescas rasuradas sem a nervura central. As folhas foram pesadas em balança de precisão, localizada em uma sala escura com iluminação verde. Após a pesagem, as folhas foram homogeneizadas em 10 mL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO), saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃) e inseridas em tubos Falcon de 15 mL, envoltos em folha de alumínio e acondicionadas em estufa sob temperatura de 65 °C, por 24 h. As amostras foram preparadas em triplicata. A saturação do DMSO seguiu o protocolo de Santos *et al.* (2008) com modificações. Para isto, o DMSO foi saturado com CaCO₃, na proporção de 5g L⁻¹ de DMSO, sob agitação constante por 4 horas e então filtrado duas vezes a vácuo em papel de filtro duplo. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos.

Após esse período, realizaram-se as leituras das absorbâncias, utilizando 3 mL das alíquotas das soluções em cubeta de quartzo, em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-control® (versão 3.37). Utilizaram-se os comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm para clorofila *a*, *b* e carotenoides, respectivamente. A leitura do branco foi realizada com DMSO saturado com CaCO₃. Todas as leituras foram realizadas no escuro e em triplicata, sendo os teores expressos em mg g⁻¹ de matéria fresca (MF), de acordo com a metodologia de Wellburn (1994), sendo:

$$\text{Clorofila } a \text{ } 649 = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$\text{Clorofila } b \text{ } 665 = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

$$\text{Carotenoide } 480 = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b) / 220;$$

Clorofila Total = Clorofila a + Clorofila b

2.11 Análises quantitativas de cardenolídeos totais

2.11.1 Extração de cardenolídeos

O doseamento de cardenolídeos totais seguiu o método validado por Silva (2017), no Laboratório de Fitoquímica da UFLA, conforme descrito na íntegra em seguida. Para a extração de cardenolídeos, as folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* foram secas em estufa ventilada a 70 °C. Posteriormente, foram pulverizadas em micromoinho de facas (MA048 - Marconi®). Uma massa de 100 mg de folhas pulverizada foi submetida à extração por sonicação com 1 mL de etanol a 70% (v/v) a 70 °C, empregando-se 1 ciclo ininterrupto de 30 min. Após esse período, o extrato foi mantido por 5 min em gelo e, em seguida, microcentrifugado a 13000 g por 10 min. Ao sobrenadante foram adicionados 300 µL de acetato de chumbo a 15% (p/v) que, após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, foi novamente centrifugado. Uma vez removido o precipitado, 200 µL de solução aquosa de fosfato monossódico (Na₂HPO₂) a 10% (p/v) foram adicionados ao sobrenadante, e, em seguida, centrifugado. O sobrenadante foi transferido para microtubos de 5 mL e a ele adicionado 1 mL de clorofórmio: isopropanol (3:2 v/v) e centrifugado a 13000 g durante 5 min. A fase inferior foi transferida para um balão e rotaevaporado até *secura*.

2.11.2 Reação de coloração e leitura das absorbâncias

Ao resíduo da extração foi adicionado um volume de 2 mL de metanol, seguido de sonicação até dissolução completa (1 a 2 min). A solução metanólica foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e, em seguida, adicionados 5 mL de reagente de Baljet (95 mL de ácido pícrico a 1% + 5 mL de solução aquosa de NaOH a 10%), dado que os glicosídeos digitálicos desenvolvem uma coloração laranja avermelhada com esse reagente, pela presença de um anel γ -lactônico insaturado em sua estrutura (BELL; KRANTZ JUNIOR, 1950), completando-se o volume com metanol. Após 20 minutos de reação, as leituras a 494 nm foram determinadas, quanto ao branco, o qual foi obtido, transferindo-se 5 mL de reagente de Baljet para um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com metanol.

Para cada solução, elaborou-se uma solução de compensação, misturando-se 2 mL de solução metanólica da amostra obtida, conforme descrito anteriormente e diluindo para 10 mL

com metanol. As leituras das absorções a 494 nm das soluções de compensação foram mensuradas quanto ao metanol. O valor de absorbância obtido, para a solução de compensação, foi então subtraído da leitura obtida para a amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata. As leituras de absorção molecular no ultravioleta foram mensuradas em espectrofotômetro TECAN Infinity® M200 PRO operado pelo *software* I-control® versão 3.37. A substância de referência utilizada nos ensaios foi a β -metildigitoxina, com grau de pureza de 97% (CLAE).

2.11.3 Doseamento dos cardenólídeos totais

Após o preparo das amostras, foram realizadas as leituras das absorbâncias a 494 nm para a determinação dos teores de cardenólídeos totais nas amostras de folhas de *D. mariana* ssp. *heywoodii*, cultivadas sob diferentes telas coloridas (azul, vermelha e preta) e, com base nos parâmetros da curva analítica, chegou-se à equação utilizada para o cálculo dos teores percentuais de cardenólídeos totais (CT), expressos em β -metildigitoxina:

$$\% \text{ CT} = 0,133 (A \text{ corrigida} - 0,0619) / m \text{ (g)}$$

Em que:

A corrigida = absorbância corrigida a 494 nm.

m = massa do material vegetal em grama.

2.11.4 Quantificação de glicoevatromonosídeo

A metodologia extrativa, utilizada neste trabalho, foi validada anteriormente (item 2.6.3.1). A massa de 125 mg de folhas secas pulverizadas foi extraída com a mistura trinária de 0,333 μL de metanol, 0,333 μL de etanol e 0,333 μL de água. A extração foi realizada por 1(um) ciclo de 31 minutos de maceração assistida por ultrassom em temperatura ambiente. O extrato foi microcentrifugado a 13000 g por 10 min. Logo depois, foram adicionados ao sobrenadante 300 μL de acetato de chumbo a 15% (p/v) e homegeinizado por vórtex por 3 segundos, em que foi mantido por 5 min em temperatura ambiente (25 °C). Depois desse período, as amostras foram novamente microcentrifugadas. Uma vez removido o precipitado, 200 μL de solução aquosa de fosfato monossódico (Na_2HPO_2) a 10% (p/v) foram adicionados ao sobrenadante, homogeinizado por vórtex e, em seguida, foi microcentrifugado. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 5 mL e a ele foi adicionado 1 mL de

clorofórmio:isopropanol (3:2 v/v) e centrifugado a 13000 g durante 5 min. A fase inferior foi transferida para um balão e, então, rotaevaporada até secura.

Os extratos foram transferidos diretamente para microtubos de 5 mL e solubilizados em 1.000 µL de metanol (MeOH) grau CLAE, seguido de sonicação até dissolução completa (1 a 2 min), seguido de centrifugação a 8.400 g, por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para vials e analisados por CLAE.

A condição cromatográfica estabelecida, conforme Tabela 16, para a quantificação de glicoevatromonosídeo (GEV), em extrato de folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, inclui o uso de coluna Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm d.i. 5 µm), temperatura da coluna de 40°C, fase móvel constituída por água ultrapura e acetonitrila grau CLAE, ambas contendo 0,1% de ácido fosfórico, fluxo: 1,5 mL min⁻¹, comprimento de onda de detecção: 230 nm e volume de injeção de 10 µL.

Tabela 16 - Condição cromatográfica estabelecida para a quantificação de GEV em extrato de folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
35	58	42
45	40	60
48	5	95
53	5	95
58	95	5
65	95	5

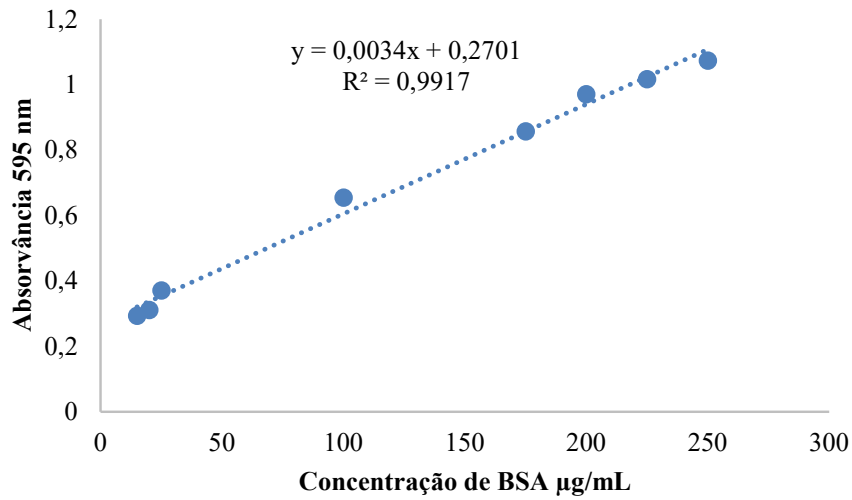
Fonte: Da autora (2020).

O cálculo, para a obtenção dos teores de GEV expressos em µg/100 g de material vegetal, foi obtido, utilizando-se a equação da curva média obtida pela linearidade $y=737784x-18718$.

2.11.5 Determinação de proteínas totais

Foram amostradas 15 mg de folhas de cada tratamento em triplicata, sendo o teor determinado conforme metodologia descrita por Bradford (1976). As leituras foram efetuadas no espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO a 595 nm e comparadas com a curva-padrão de soro albumina bovina (BSA) 1 g L⁻¹, a qual foi ajustada por regressão linear, resultando na equação: $y = 0,0034x + 0,2701$ ($R^2 = 0,9917$) (FIGURA 1). A partir de então, foi determinada a concentração de proteína foliar, expressa em mg mL⁻¹ extrato proteico.

Figura 1 - Curva-padrão de soro albumina bovina (BSA), com coeficiente linear (R^2).



Fonte: Da autora (2021).

2.12 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas ao teste de Scott-Knott, ambas a 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2019) foi utilizado para o processamento dos dados. E o software Statística®, versão 13.3 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA) foi utilizado para análise de componentes principais (PCA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Otimização extrativa

3.1.1 Planejamento simplex-centroide

Soluções hidroalcolicas são amplamente empregadas na extração de substâncias de origem vegetal (ABRAHAM *et al.*, 2020; FARHADI *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020; SALEEM *et al.*, 2020; SALOMÓN *et al.*, 2020; TLILI; SARIKURKCU, 2020; XIE *et al.*, 2020). Em estudos sobre as espécies do gênero *Digitalis*, o uso de um único solvente não é unânime para a extração dos cardenolídeos, como exemplo, pode-se observar que, para *Digitalis lanata*, tem-se o uso do metanol (BRAGA *et al.*, 1997; KIRMIZIBEKMEZ *et al.*, 2009; MOORE; TAYLOR, 1996), de clorofórmio e etanol (IKEDA; FUJI, 2003) e do etanol (STUHLEMMER *et al.*, 1993; YOSHIMATSU *et al.*, 1990). Para *Digitalis purpurea* os estudos utilizaram o metanol (KURODA *et al.*, 2013; PÉREZ-ALONSO *et al.*, 2009; PÉREZ-BERMÚDEZ *et al.*, 2010), o etanol (OH *et al.*, 2005) e a água (FARAH *et al.*, 2010), sendo essas duas espécies as mais exploradas. Já para a subespécie *Digitalis purpurea ssp. heywoodii*, o metanol foi utilizado por Navarro *et al.* (2000).

A partir das áreas obtidas nas sete condições testadas, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 17 com a estimativa dos fatores (solventes).

As variáveis (metanol, etanol e água) foram avaliadas de forma separada, quanto aos seus coeficientes (valor da equação gerada), o limite máximo e mínimo de confiabilidade do modelo e o valor de p , sendo esse um valor de medida que evidencia a discrepância estatística em relação aos dados apresentados.

Tabela 17 - Mistura de solventes (metanol, etanol e água), com suas respectivas áreas do pico do glicoevatromonosídeo (GEV) e valor de similaridade espectral. Lavras, MG, 2021.

Extrato	Solventes (mL)			Área	Similaridade
	Metanol	Etanol	Água		
1	0,33	0,33	0,33	495322 a	0,99
2	1	0	0	102832 d	0,97
3	0,5	0,5	0	32449 d	0,94
4	0	1	0	215784 c	0,99
5	0	0,5	0,5	50679 d	0,95
6	0	0	1	52156 d	0,95
7	0,5	0	0,5	300201 b	0,99

Fonte: Da autora (2021).

Médias seguidas pela mesma letra não diferenciam entre si estatisticamente, de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 18 - Estimativa das variáveis (metanol, etanol e água) em relação ao seu coeficiente, erro, valor de p e limites dos coeficientes. Lavras, MG, 2021.

Fator	Coeficiente	Erro	T	P	-95%	+95%
					Cnf. Limite	Cnf. Limite
Metanol	324141	146408	2,21	0,09	-82355	730637
Etanol	166836	146408	1,13	0,32	-239660	573332
Água	44488	146408	0,30	0,78	362007	450985

Fonte: Da autora (2021).

Analisando os valores máximos (730637, 573332 e 450985) e mínimos (-82355, -239660 e 362007) dos coeficientes do modelo, os quais são valores capazes de descrever o tamanho e a direção da relação entre um valor predito (calculado) e a variável resposta, observa-se que os coeficientes de duas variáveis (metanol e etanol) foram insignificantes, ao nível de confiança de 95%, ou seja, a barra de erro contempla o zero. Com isso, de acordo com os valores dos coeficientes, os valores calculados, longe dos valores esperados para o modelo, geraram um limite de confiança ruim. Nota-se, também, que os valores de p foram maiores que 0,05 ($F_c < F_t$), demonstrando a baixa confiabilidade (capacidade preditiva) do modelo.

De acordo com os valores apresentados, conclui-se que apenas esses valores não passariam informações suficientes para cada solvente testado. Na Tabela 19, apresenta-se o

valor de probabilidade de significância (p -valor), F calculado e a variância explicada (R^2) para o modelo linear gerado para os solventes.

Tabela 19 - ANOVA do modelo linear. Lavras, MG, 2021.

Modelo	Efeito	GL do efeito	F	P	R²
Linear	4,913300E	2	0,774	0,519	0,279

Fonte: Da autora (2021).

Verifica-se que o valor da variância explicada (R^2) é de 0,279 informa que a porcentagem de informação que o modelo é capaz de explicar está muito baixa.

Baseado nesse parâmetro, concluiu-se que só o parâmetro solvente não gerou resposta com diferença estatística suficiente para gerar modelos confiáveis. Neste contexto, baseado na similaridade espectral com o padrão e a maior área do pico no cromatograma, foi avaliada qual a melhor mistura de solventes, conforme Tabela 17. Observa-se que a melhor mistura de solventes encontrada, de acordo com a maior área obtida (495322) e similaridade (0,99), foi o extrato número 1 (um), que apresentou a mistura de solventes na proporção de 0,33 μL de metanol, 0,33 μL de etanol e 0,33 μL de água.

3.1.2 Planejamento Fatorial completo

A partir da escolha da melhor mistura de solventes (0,33 μL de metanol, 0,33 μL de etanol e 0,33 μL de água), que contemplasse a maior extração de GEV em área, foi realizado o planejamento fatorial completo para as variáveis: razão droga vegetal por solvente extrator (X_1 , mg mL^{-1}), tempo de maceração assistida por ultrassom (X_2 , min.), temperatura do banho de ultrassom (X_3 , $^{\circ}\text{C}$) e número de ciclos de extração (X_4), conforme Tabela 20.

Tabela 20 - Variáveis X_1 , X_2 , X_3 e X_4 e suas respectivas áreas e número de ciclos. Lavras, MG, 2021.

Amostra	X_1 (mg mL ⁻¹)	X_2 (min.)	X_3 (°C)	X_4	Área
1	20	5	25	1	8801245 a
2	100	5	25	1	1455373 g
3	20	30	25	1	814531 h
4	100	30	25	1	2458364 e
5	20	5	70	1	3258487 d
6	100	5	70	1	1035840 h
7	20	30	70	1	729174 h
8	100	30	70	1	2992943 d
9	20	5	25	3	1380790 g
10	100	5	25	3	5594596 b
11	20	30	25	3	1894758 f
12	100	30	25	3	2366348 e
13	20	5	70	3	782669 h
14	100	5	70	3	2737197 e
15	20	30	70	3	2492834 e
16	100	30	70	3	3514080 c

Fonte: Da autora (2021).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Scott-Knott, (5%).

Na Tabela 21, é possível observar os valores dos coeficientes analisados quanto ao seu efeito, valor de p e de confiabilidade dos coeficientes, assim como observar que todos os coeficientes passaram pelo 0, demonstrando que as variáveis foram insignificantes, ao nível de 95% de confiança, sendo esse uma razão para recalculá-lo. Além disso, apresentaram valores de p maiores que 0,05, para todos os fatores, indicando que o F calculado é menor que o F tabelado e comprovando que as variáveis, sejam elas analisadas separadamente ou com suas interações, geram um modelo que precisa de ajustes.

Tabela 21 - Estimativa das variáveis em relação ao seu efeito, valor de *p* e limites dos coeficientes. Lavras, MG, 2021.

Fator	Efeito	Erro	<i>P</i>	-95% Cnf. Limite	+95% Cnf. Limite
1	250031	457013	0,830	-5681896	5931928
2	-972896	914027	0,480	-6293360	5320464
3	-902848	914027	0,503	-6258336	5355488
4	-97836	914027	0,932	-5855830	5757994
1x2	100078	914027	0,441	-5256873	6356951
1x3	504193	914027	0,679	-5554816	6059008
1x4	1665261	914027	0,319	-4974281	6639542
2x3	1451605	914027	0,357	-5081109	6532714
2x4	116088	914027	0,499	-5348868	6264956
3x4	475420	914027	0,694	-5569202	6044622
1x2x3	-211769	914027	0,855	-5912809	5701015
1x2x4	2268952	914027	0,243	-6941388	4672436
1x3x4	-931598	914027	0,493	-6272711	5341113
2x3x4	-151273	914027	0,895	-5882548	5731275

Fonte: Da autora (2021).

Analisando os dados de forma direta (TABELA 20), para as variáveis razão-droga-vegetal por solvente extrator (X_1 , mg mL⁻¹), tempo de maceração assistida por ultrassom (X_2 , min.), temperatura do banho de ultrassom (X_3 , °C) e número de ciclos de extração (X_4), na maioria dos experimentos, quanto maior a quantidade de droga vegetal maior a área do GEV no cromatograma, sendo ele aplicado para tempo de maceração no ultrassom e número de ciclos de extração. Porém, quando se observa a área de GEV, para a temperatura do banho de ultrassom, é possível analisar que essa relação é inversamente proporcional, ou seja, quanto menor a temperatura, maior a área do pico, por esse motivo a temperatura de 25 °C é utilizada para a extração.

Com base nesses valores de área, a variável temperatura do ultrassom foi removida do modelo que foi recalculado.

Na Tabela 22 é possível observar os fatores analisados e suas interações com os valores do efeito, valor de *p*, F tabelado e limites dos coeficientes.

Tabela 22 - Tabela dos efeitos do modelo recalculado para a resposta área do pico de GEV. Lavras, MG, 2021.

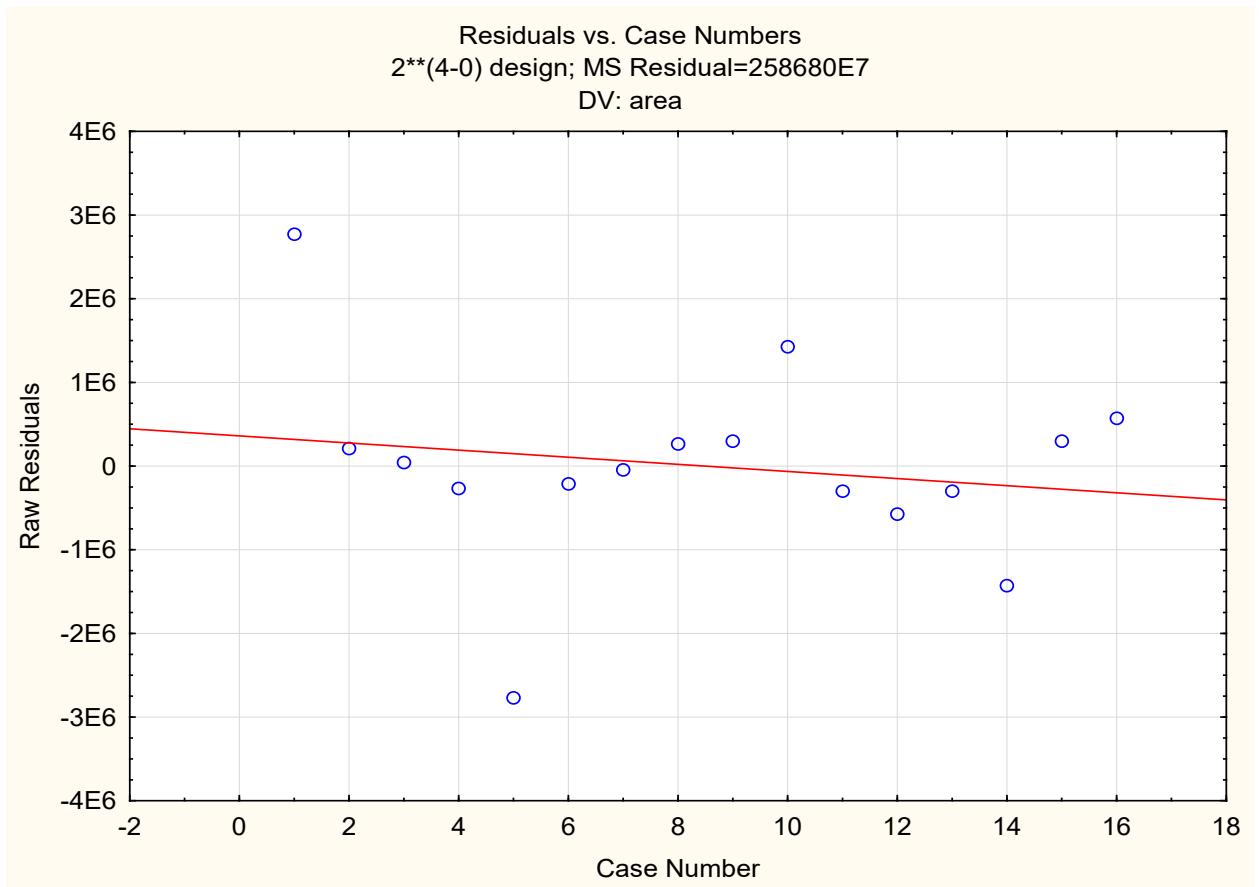
Fator	Efeito	GL	MQ	F	p	95% Cnf. Limite	+95% Cnf. Limite
1	250031	1	2,500629E+11	0,096	0,763	-802201	1052232
2	-972896	1	3,782104E+12	1,463	0,260	-1413664	440768
4	-97836	1	3,828734E+10	0,014	0,906	-976134	878298
1x2	1100078	1	4,840686E+12	1,871	0,208	-377177	1477255
1x4	1665261	1	1,109237E+13	4,288	0,072	-94586	1759847
2x4	916088	1	3,356866E+12	1,297	0,287	-469172	1385260
1x2x4	-2268952	1	2,059258E+13	7,960	0,022	-2061692	-207260

Fonte: Da autora (2021).

Recalculando o modelo sem a variável temperatura do banho de ultrassom, pode-se observar que as variáveis analisadas, quantidade de droga vegetal x tempo de maceração assistida por ultrassom, quantidade de droga vegetal x número de ciclos e tempo do banho de ultrassom x número de ciclos, não exerceu efeito significativo, na faixa testada sobre o processo extrativo, visando maximizar a recuperação de GEV, com p valores maiores que 0,05 ($F_c < F_t$), demonstrando a falta de ajuste do modelo e coeficientes passando pelo zero. O mesmo não acontece, quando se observa a interação das variáveis, quantidade de droga vegetal x tempo de maceração assistida por ultrassom x número de ciclos com valores dos coeficientes do modelo de terceira ordem que não passaram por zero, demonstrando a significância do modelo, ao nível de confiança de 95%, sendo sua capacidade preditiva boa, demonstrando a confiabilidade do modelo para fazer previsões. Além disso, a interação entre as três variáveis é de fato importante para se obter uma maior área do pico de GEV.

Analisando a Figura 2 (resíduo x número de casos), pode-se observar a qualidade do modelo.

Figura 2 - Qualidade do modelo demonstrada pelo resíduo *versus* número de casos.



Fonte: Da autora (2021).

Dos 16 experimentos analisados, é possível analisar que os resíduos têm uma distribuição aleatória (heterocedasticidade), ou seja, não tem agrupamento. Observa-se, também, o erro para cada experimento realizado, sendo esses de valores muito baixos (próximos a retas), com exceção de quatro pontos, sabendo que, para o planejamento fatorial completo, quando se muda a condição de um experimento para outro, as respostas devem sofrer uma alteração perceptível, demonstrando assim a qualidade dos dados obtidos.

3.1.3 Planejamento Composto Central (ajuste fino dos resultados)

Após identificar entre as quatro variáveis testadas: razão-droga-vegetal por solvente extrator (X_1 , mg mL⁻¹), tempo de maceração assistida por ultrassom (X_2 , min.), temperatura do banho de ultrassom (X_3 , °C) e número de ciclos de extração (X_4), aquelas que são mais significativas tanto do ponto estatístico, observou-se a interação das variáveis, quantidade de droga vegetal x tempo de maceração assistida por ultrassom x número de ciclos, demonstrando

a confiabilidade e significância do modelo para fazer predições e a interação entre as três variáveis de fato é importante para se obter maior área do pico de GEV.

A proposta, a seguir, foi efetuar um ajuste fino dessas variáveis mais importantes, no sentido de propor um modelo empírico correlacionando as variáveis estudadas com as respostas que estão sendo monitoradas.

Na Tabela 23, são apresentadas as respostas para cada coeficiente gerado, sendo esses linear (L) e quadrático (Q).

Tabela 23 - Fatores e suas possíveis interações em relação ao seu efeito, valor de p e limites dos coeficientes. Lavras, MG, 2021

Fator	Efeito	t	P	Coefficiente	95% Cnf. Limite	+95% Cnf. Limite
1x1 (L)	163926	63,22	0,00025	81962,8	76385,2	87540,5
2x2 (L)	90861	35,04	0,0008	45430,3	39852,7	51007,9
x2 (Q)	129698	45,40	0,0004	64848,9	58704,2	70993,7
3x3 (L)	189854	73,22	0,0001	94926,8	89349,2	100504,5
x3 (Q)	55659	19,48	0,002	27829,4	21684,7	33974,2
1 L por 2	-131510	-38,83	0,00066	-65754,8	-73039,1	-58470,5
1 L por 3	-83019	-24,51	0,0016	-41509,5	-48793,8	-34225,2
2 L por 3	176459	52,11	0,0003	88229,5	80945,2	95513,9

Fonte: Da autora (2021).

Nota-se que os coeficientes dos modelos obtiveram valores de p menores que 0,05 ($F_c > F_t$) e seus coeficientes não passam pelo zero, demonstrando a significância dos modelos, ao nível de confiança de 95%, com uma variância explicada (R^2) aceitável de 0,76, com exceção do modelo quadrático gerado, para o fator X_I (quantidade de droga vegetal), por esse motivo, o modelo é recalculado sem o coeficiente quadrático para X_I conforme apresentado na Tabela 23.

Nota-se na Tabela 24 os dados sobre a confiabilidade dos modelos gerados e suas interações.

Tabela 24 - ANOVA aplicada à confiabilidade dos modelos gerados e suas interações.

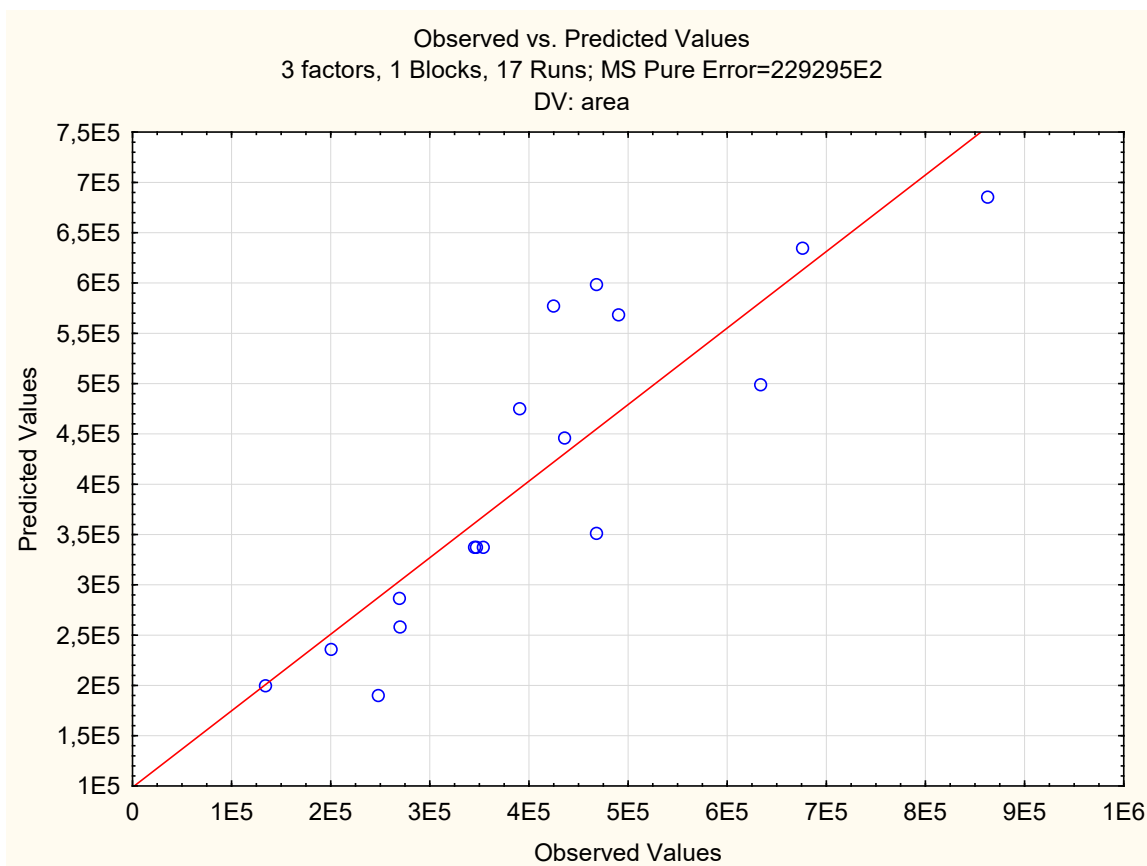
Fator	GL	SQ	F	P
1x1 (L)	1	9,166450E+10	3997,66	0,00025
2x2 (L)	1	2,816166E+10	1228,18	0,00081
X2 (Q)	1	5,282934E+10	2303,98	0,00043
3x3(L)	1	1,229547E+11	5362,20	0,00018
X3 (Q)	1	9,993483E+09	435,83	0,0022
1 l por 2 L	1	3,458954E+10	1508,51	0,00066
1 L por 3 L	1	1,378431E+10	601,16	0,0016
2 L por 3 L	1	6,227562E+10	2715,95	0,00036

Fonte: Da autora (2021).

Observa-se que todos os modelos obtiveram valores de p menores que 0,05 com $F_c > F_t$ demonstrando a confiabilidade do sistema e a não necessidade de ajuste dos modelos.

Corroborando com os resultados, tem-se o histograma do resíduo demonstrando a sua distribuição normal (ANEXO A) e a Figura 3 com os valores observados e preditos encontrados para os modelos.

Figura 3 - Resposta experimental em função da resposta prevista pelo modelo proposto.



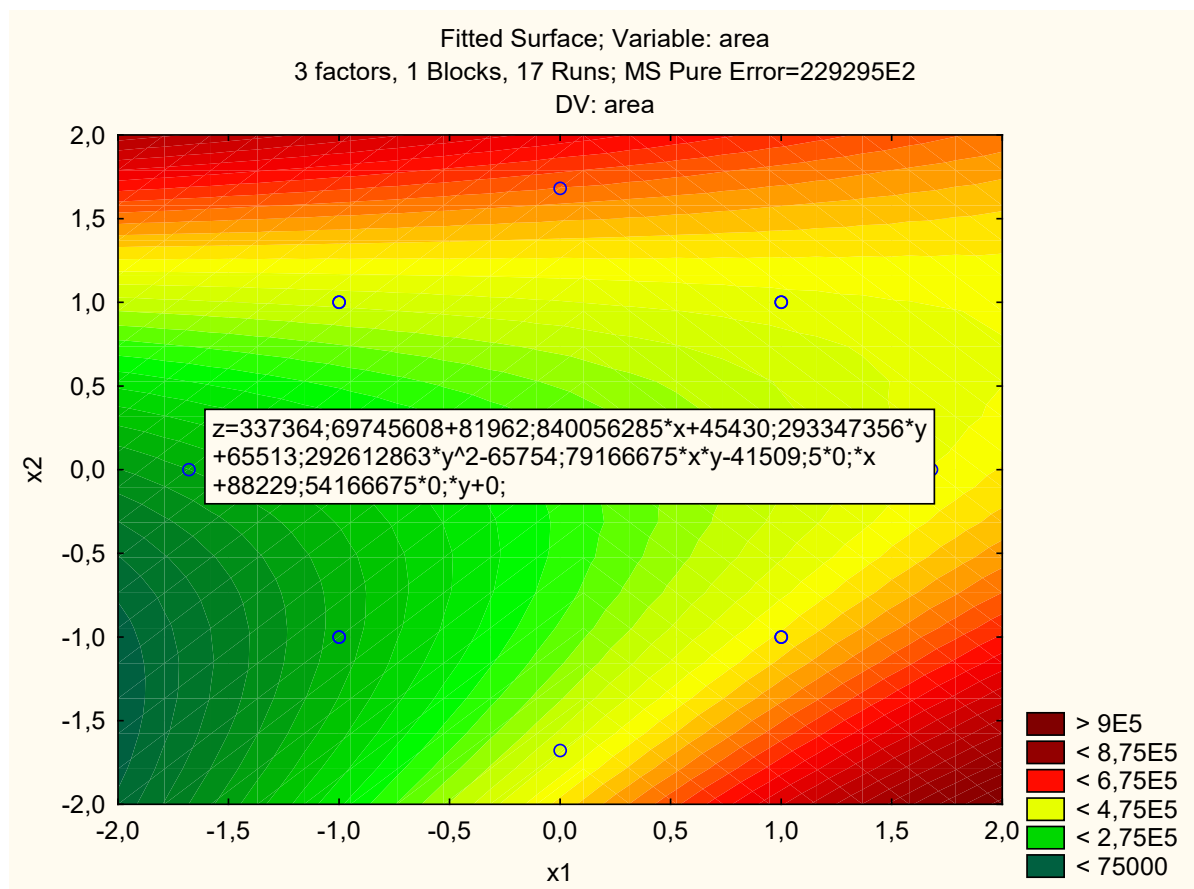
Fonte: Da autora (2021).

A Figura 3 demonstra os valores observados em função das respostas previstas pelo modelo. É possível verificar que há uma boa concordância entre as respostas reais (observadas) e aquelas previstas pelo modelo, confirmando o bom ajuste do mesmo constatado nas Tabelas 19 e 20 (modelos recalculados sem o quadrático ANOVA). Outro parâmetro a ser observado é o comportamento dos resíduos, ou seja, a diferença entre os valores experimentais e os previstos. Nota-se que eles se comportam de forma aleatória, portanto heterocedásticos.

Com os modelos gerados, pode-se então visualizar o gráfico de contorno, ou seja, a visualização superior da superfície de resposta gerada para as variáveis, quantidade de droga vegetal (mg), tempo de maceração assistida por ultrassom (min) e número de ciclos, em que se

pode observar uma região (vermelho) de máximo sinal analítico. Na Figura 4, tem-se, por meio dos contornos, as respostas previstas em área, pelo modelo dado, em função da variável razão-droga-vegetal por solvente extrator ($X_1/\text{mg mL}^{-1}$) versus tempo de maceração assistida por ultrassom (X_2/min).

Figura 4 - Gráfico de contorno com as respostas em áreas previstas pelo modelo para a variável razão-droga-vegetal por solvente extrator ($X_1/\text{mg/mL}$) versus tempo de maceração assistida por ultrassom (X_2/min). Lavras, MG, 2021.

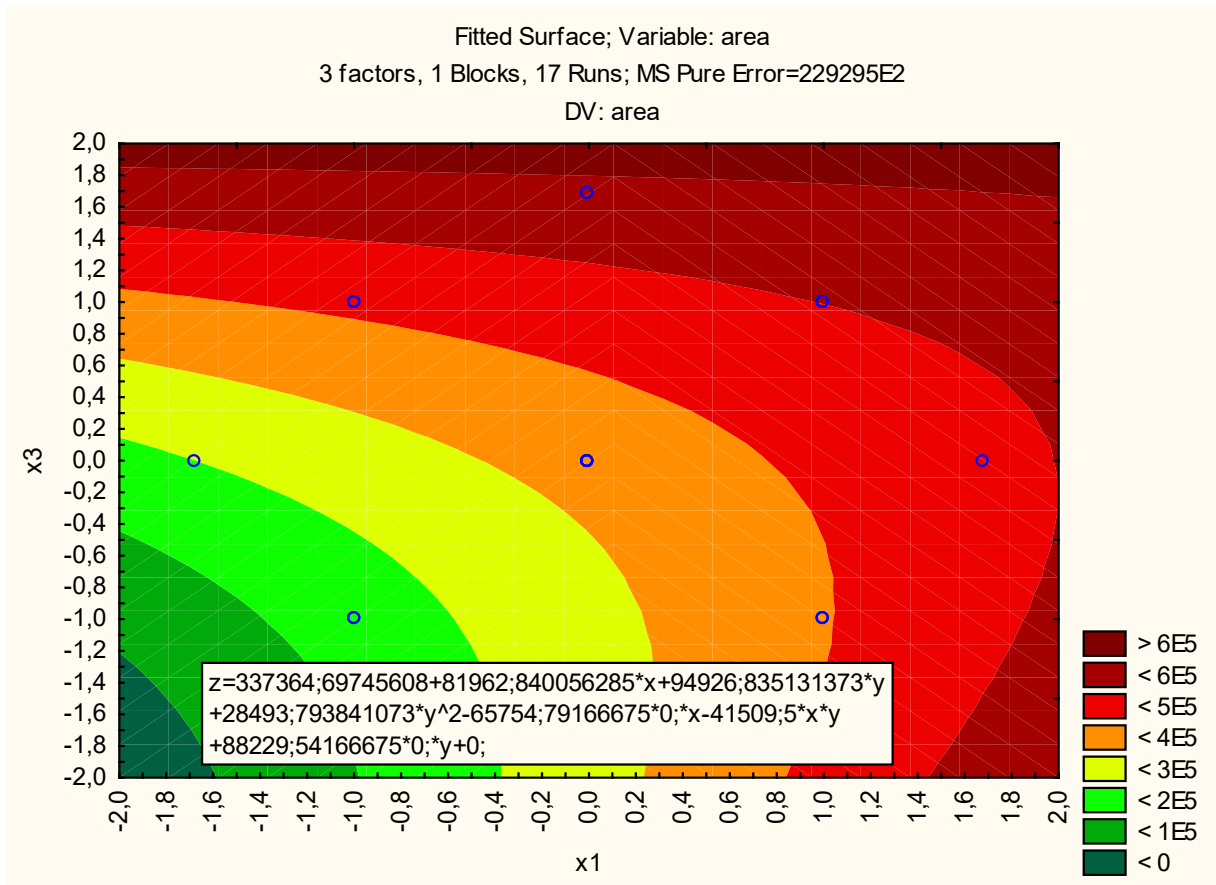


Fonte: Da autora (2021).

Na Figura 4, é possível observar que existe uma região em vermelho cuja resposta em área de GEV foi máxima, ou seja, com o máximo de tempo investido na maceração assistida por ultrassom e a maior quantidade de droga vegetal maior será a área do pico de GEV, então, de acordo com o nível máximo de 1,68 (variável codificada), para razão-droga-vegetal por solvente, tem-se $X_1 = 125 \text{ mg mL}^{-1}$ e a maior quantidade de tempo em maceração assistida por ultrassom de $X_2 = 30$ minutos.

Na Figura 5, o gráfico de contorno mostra a máxima área de GEV, em função da variável razão-droga-vegetal por solvente extrator ($X_1 \text{ mg mL}^{-1}$) versus número de ciclos.

Figura 5 - Gráfico de contorno com as respostas em áreas previstas pelo modelo para a variável quantidade de droga vegetal ($X_1 \text{ mg}^{-1}$) versus número de ciclos (X_3). Lavras, MG, 2021.

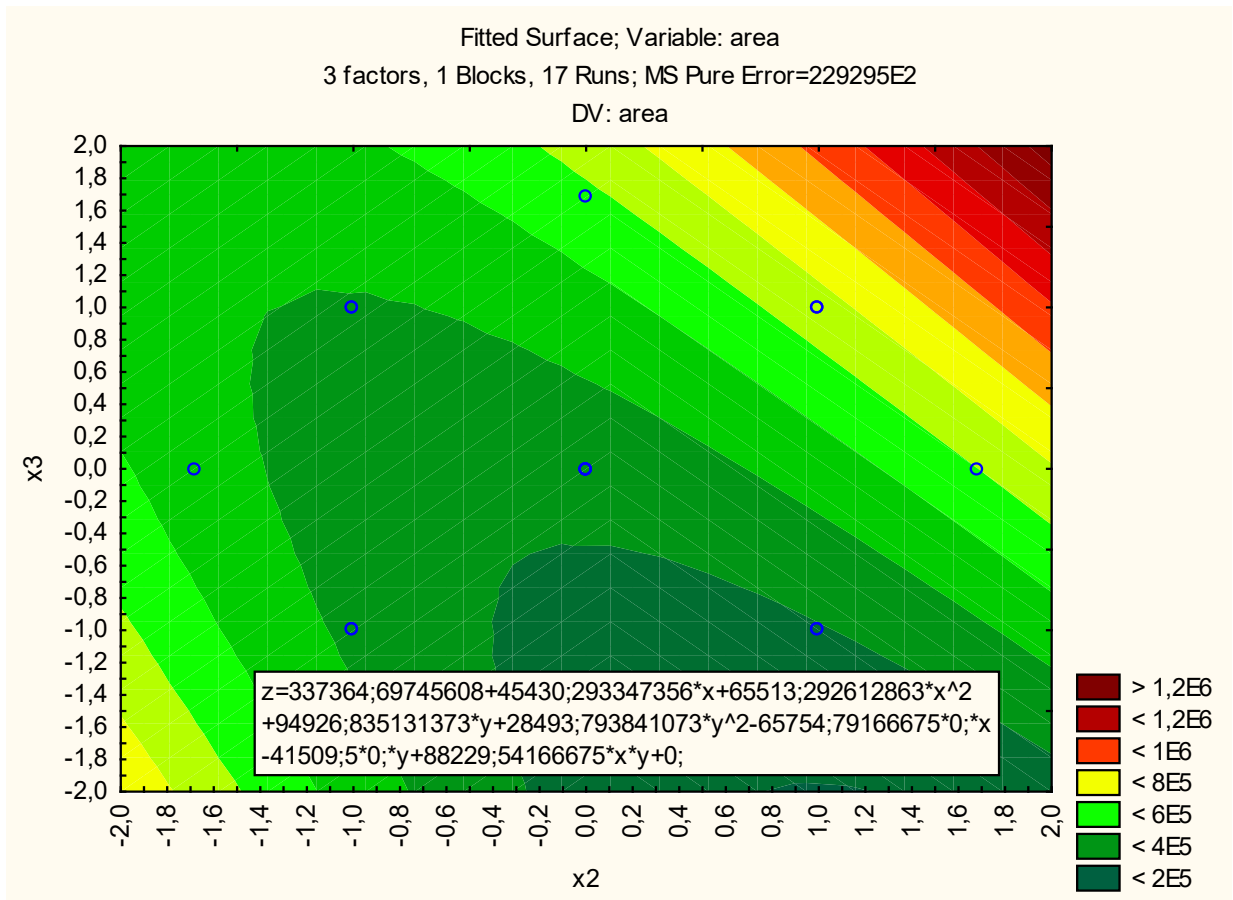


Fonte: Da autora (2021).

O gráfico de contorno com as respostas máximas, em área em função da quantidade de droga vegetal ($X_1 \text{ mg}^{-1}$) versus número de ciclos, demonstrou os máximos valores de quantidade de droga vegetal para o maior número de ciclos, na obtenção de maiores valores de área de GEV, sendo $X_1 = 125 \text{ mg}$ de droga vegetal por solvente extrator ($X_1/\text{mg mL}^{-1}$) e $X_3 = 5$ ciclos.

Na Figura 6, o gráfico de contorno demonstra, em função da variável tempo de maceração assistida por ultrassom ($X_2 \text{ min}^{-1}$) versus número de ciclos, a máxima recuperação de GEV.

Figura 6 - Gráfico de contorno com as respostas em áreas previstas pelo modelo para a variável, tempo de maceração assistida por ultrassom ($X_2 \text{ min}^{-1}$) versus número de ciclos (X_3). Lavras, MG, 2021.



Fonte: Da autora (2021).

O gráfico de contorno, apresentado na Figura 6, corrobora com os gráficos das Figuras 4 e 5, sendo o maior tempo de maceração no ultrassom ($X_2=30 \text{ min}$) com o maior número de ciclos ($X_3=5$ ciclos), para garantir a máxima extração de GEV.

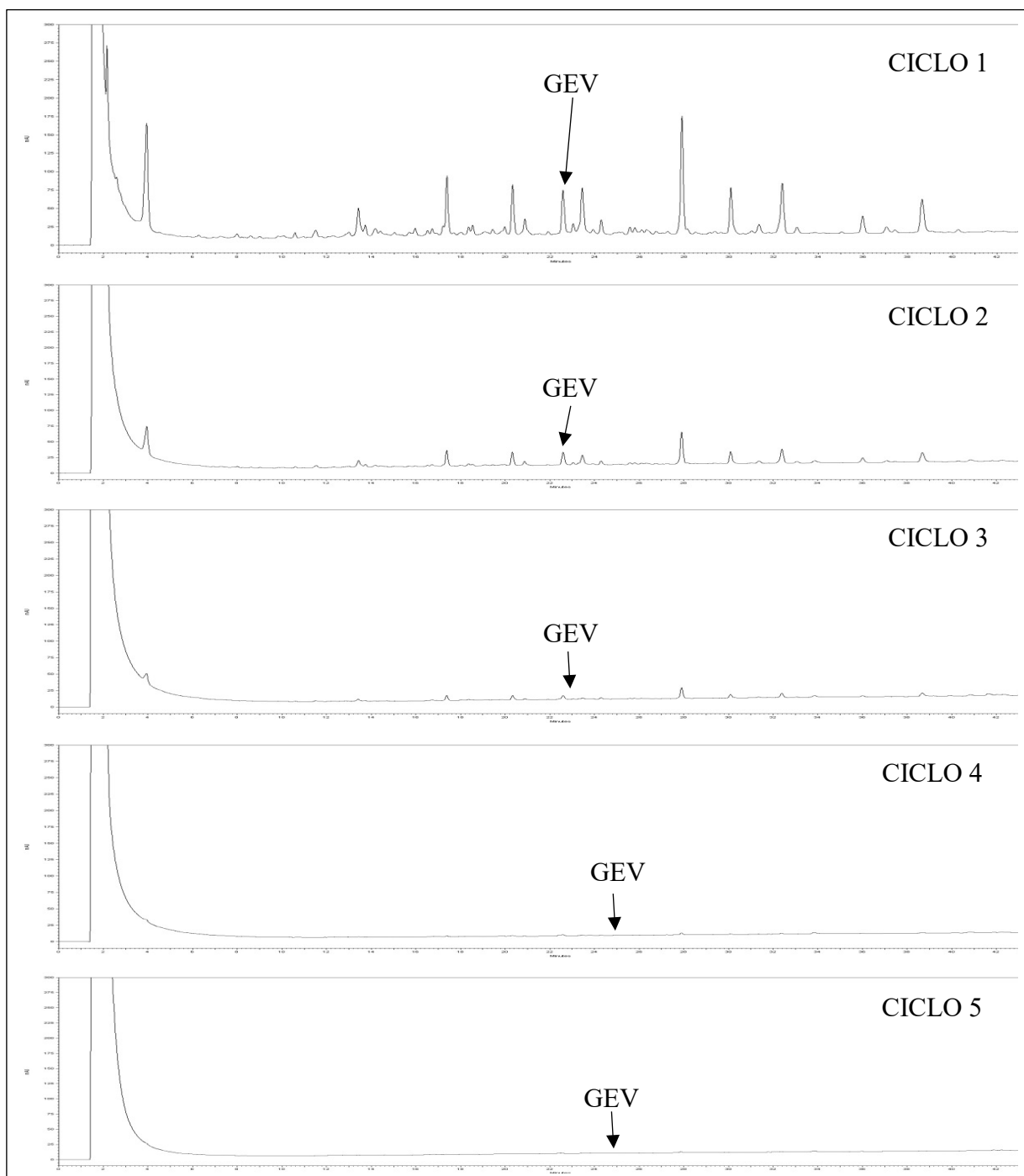
As condições ótimas de extração, obtidas a partir dos gráficos de contorno, destacaram as variáveis, quantidade de droga vegetal, tempo de maceração no ultrassom e número de ciclos associadas aos seus valores de 125 mg, 31 minutos e 5 ciclos respectivamente, maximizando a área de GEV, associadas à melhor mistura de solventes (0,33 μL de metanol, 0,33 μL de etanol e 0,33 μL de água), sendo essas obtidas pelo modelo simplex centroid.

O planejamento composto central identificou as melhores condições de trabalho, para as variáveis analisadas, mas, observando os resultados encontrados, nota-se também a necessidade de se reduzir o esforço experimental, não sendo esse propósito alcançado com a utilização de 5 ciclos de extração, sendo esses de 30 minutos cada um, totalizando 2 horas e 30 minutos totais de extração para a máxima recuperação do GEV. Por esse motivo, foi realizado

um experimento, visando analisar o perfil cromatográfico de cada ciclo isoladamente, a fim de reduzir o tempo de extração e o erro contido na realização de cada ciclo.

Os perfis cromatográficos obtidos são apresentados na Figura 7, com os cromatogramas representativos de cada ciclo de extração, acompanhados da Tabela 25 com suas respectivas áreas e purezas do pico de GEV.

Figura 7 - Cromatogramas representativos de cada ciclo de extração referente aos experimentos de otimização extrativa. Para a avaliação de resultados compare com a Tabela 25.



Fonte: Da autora (2021).

Tabela 25 - Tempo de retenção, área e pureza do pico de GEV representativo de cada ciclo de extração.

Ciclo	TR	Área	Extração (%)	Pureza
1	23,03	489.221	88	0,99
2	23,03	42.304	7	0,99
3	23,05	26.132	5	0,99
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-

Fonte: Da autora (2021).

Analisando os cinco ciclos de forma separada, nota-se que apenas o ciclo 1(um) apresentou maior área do pico, ou seja, um pico visível e 88% da GEV extraído no primeiro ciclo. Entretanto, nos ciclos 2 e 3, não houve picos bem definidos e uma extração de GEV de 7% e 5%, respectivamente, por esse motivo, adotou-se apenas um ciclo na extração de GEV. Desta forma, para a otimização extrativa de *Digitalis mariana ssp. heywoodii*, foram determinadas as condições ótimas de extração, conforme Tabela 26.

Tabela 26 - Condição extrativa para o preparo de amostras de *Digitalis mariana ssp. heywoodii* para a quantificação de GEV por CLAE-DAD.

Variável	Condição
Metanol, Etanol e Água (µL)	0,333
Droga Vegetal (mg)	125
Tempo de maceração (min.)	31
Número de ciclos	1

Fonte: Da autora (2021).

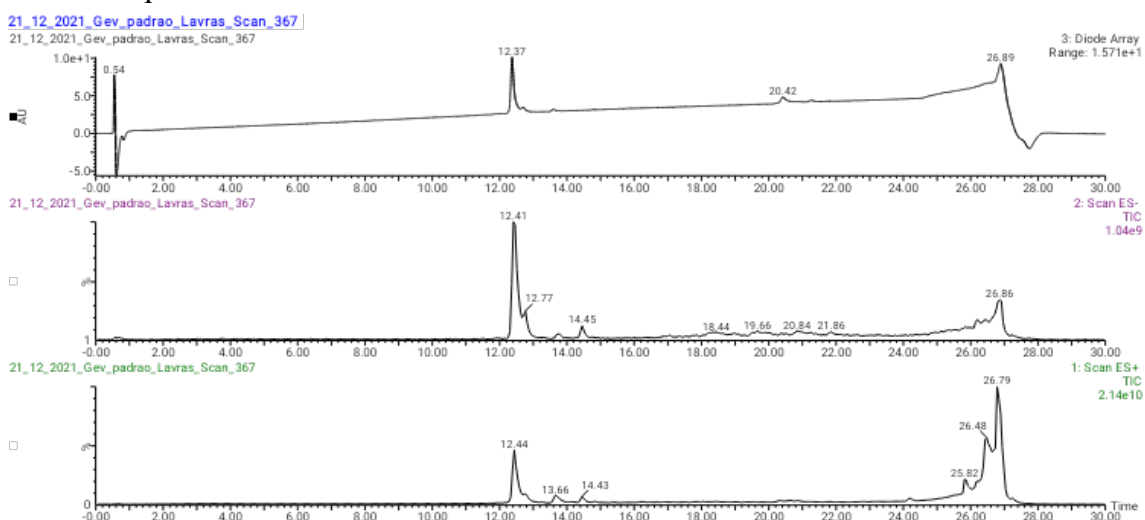
3.1.4 Desenvolvimento de método por CLAE-DAD para a quantificação de GEV em folhas de *Digitalis mariana ssp. heywoodii*

O desenvolvimento da condição cromatográfica, para a quantificação de GEV, partiu do método proposto por Kreis, Haug e Yücesan (2015), após ajustes finos realizados nas condições de fluxo, força do modificador orgânico e inclinação do gradiente e chegou-se à condição estabelecida. O perfil cromatográfico da condição estabelecida está representado na Figura 12, no item 3.1.5.3, em que se discutem a caracterização do pico do GEV e a seletividade do método.

3.1.5 Identificação de glicoevatromonosídeo (GEV) nos extratos de *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* (P. Silva and M. Silva) Hinz por técnicas cromatográficas hífenadas

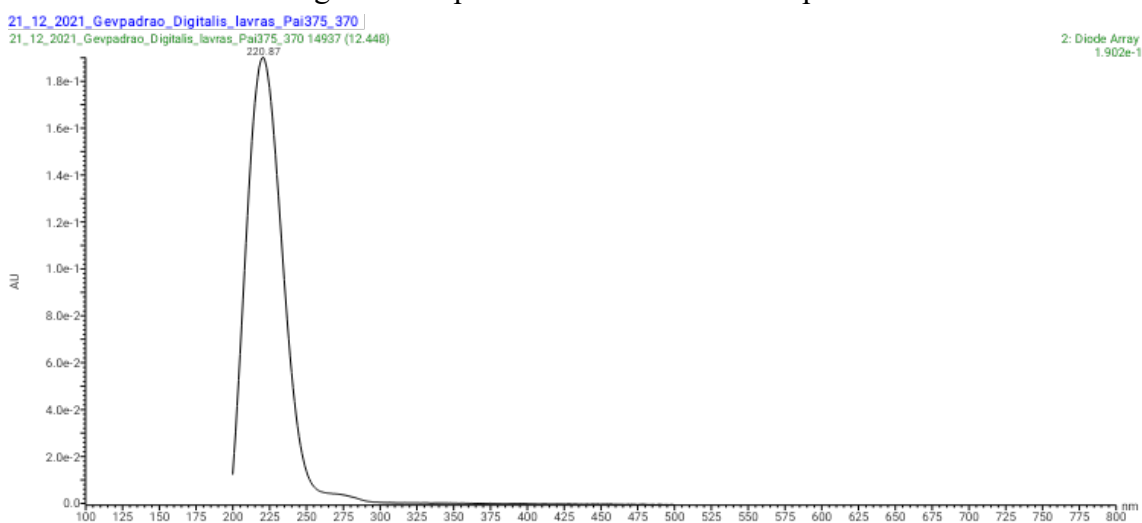
O perfil cromatográfico, obtido para o padrão de GEV, apresenta um pico com tempo de retenção de 12,37 min (FIGURA 8). O perfil obtido pelo detector DAD demonstra um pico com máximo de absorção de 220,8 nm compatível com a presença da lactona α,β -insaturada de cinco membros presentes nos glicosídeos cardíacos (FIGURA 9).

Figura 8 - Cromatogramas obtidos pelo detector PDA e de massas no modo positivo e negativo para a análise de GEV.



Fonte: Da autora (2021).

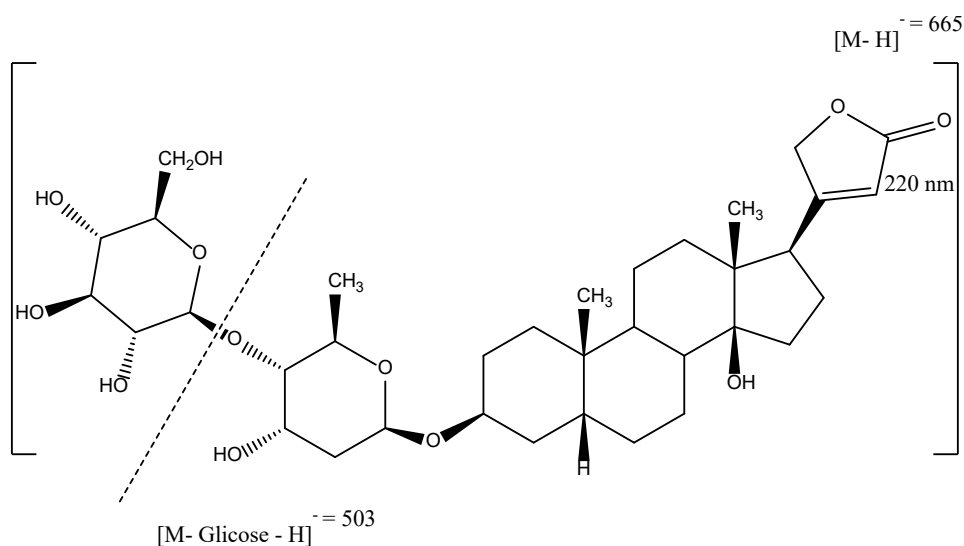
Figura 9 - Espectro de UV/DAD obtido para GEV.



Fonte: Da autora (2021).

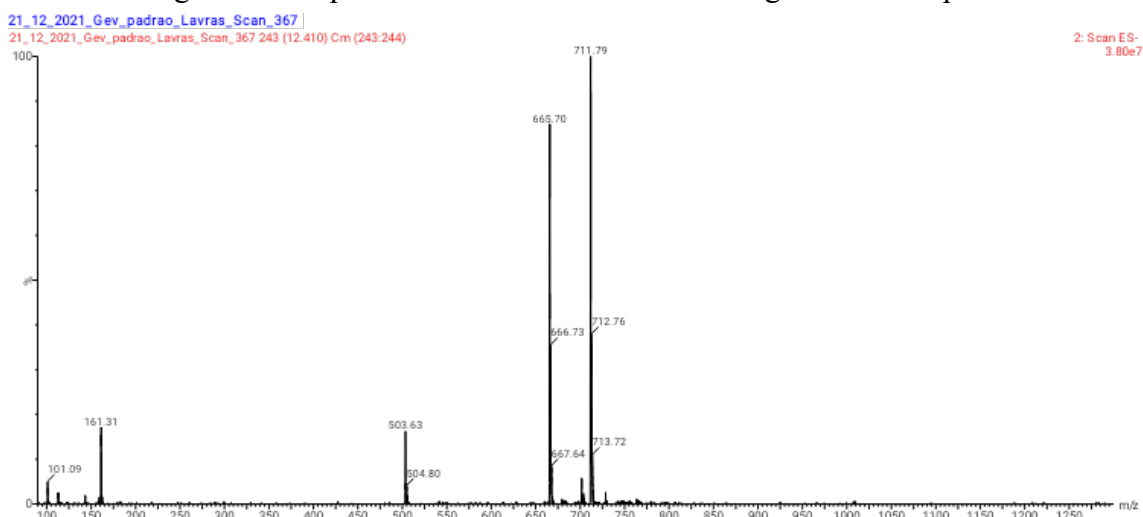
O espectro de massas no modo negativo (Scan) apresenta três fragmentos característicos da estrutura de GEV, $[M - H]^- = 665,70$ Da, $[M + \text{HCOOH} - H]^- = 711,79$ Da (Adubo com ácido fórmico presente na fase móvel) e $[M - \text{Glicose} - H]^- = 503,63$ Da (FIGURA 10 e 11).

Figura 10 - Principais fragmentos obtidos no espectro de massas de GEV no modo negativo SCAN.



Fonte: Da autora (2021).

Figura 11 - Espectro Massas no modo SCAN negativo obtido para GEV.

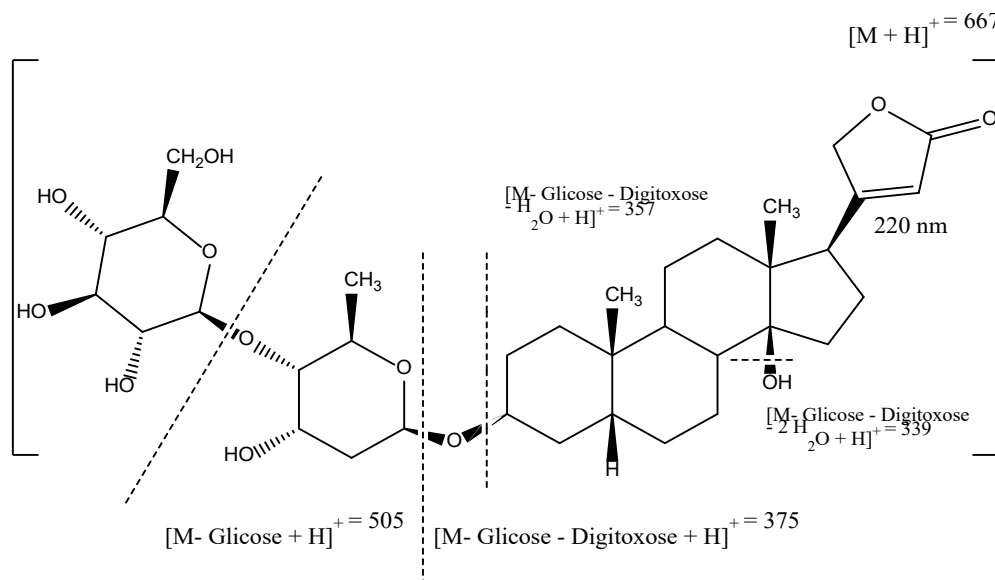


Fonte: Da autora (2021).

O espectro de massa de massas no modo positivo também demonstrou a presença de fragmentos característicos de GEV, $[M + H]^+ = 667$ Da; $[M - \text{Glicose} + H]^+ = 505$ Da; $[M - \text{Glicose} - \text{Digitoxose} + H]^+ = 375$ “Digitoxigenina”, além dos fragmentos 357 Da e 339 Da,

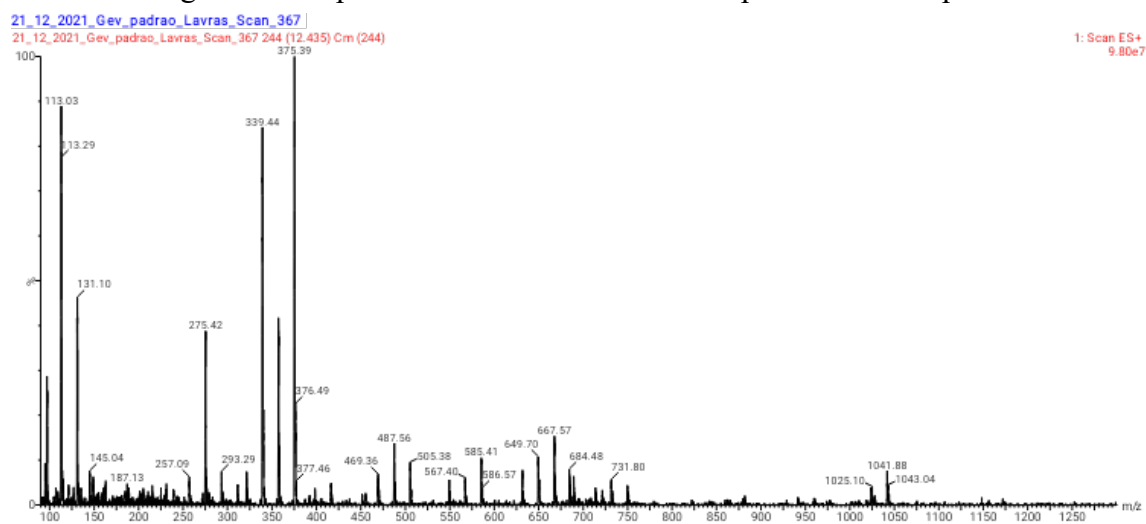
referentes à perda de uma e duas moléculas de água, a partir do fragmento da “digitoxigenina”, respectivamente (FIGURAS 12 e 13).

Figura 12 - Principais fragmentos obtidos no espectro de massas de GEV no modo positivo SCAN.



Fonte: Da autora (2021).

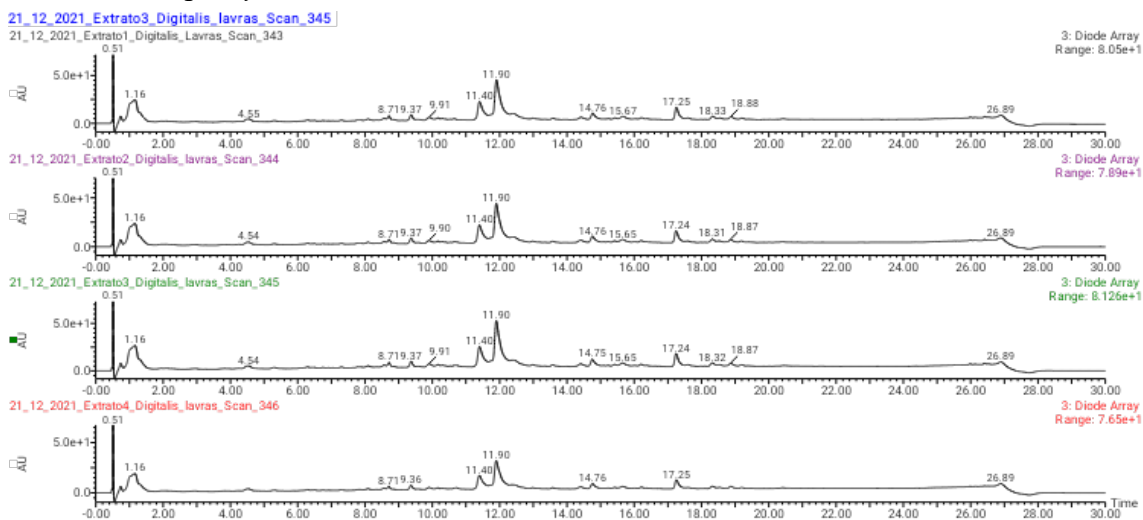
Figura 13 - Espectro Massas no modo SCAN positivo obtido para GEV.



Fonte: Da autora (2021).

A análises dos cromatogramas obtidos nos extratos de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* no modo UV/DAD não evidenciou claramente um pico com boa resolução no tempo de retenção observado para o padrão de GEV (12,37 min) (FIGURA 14).

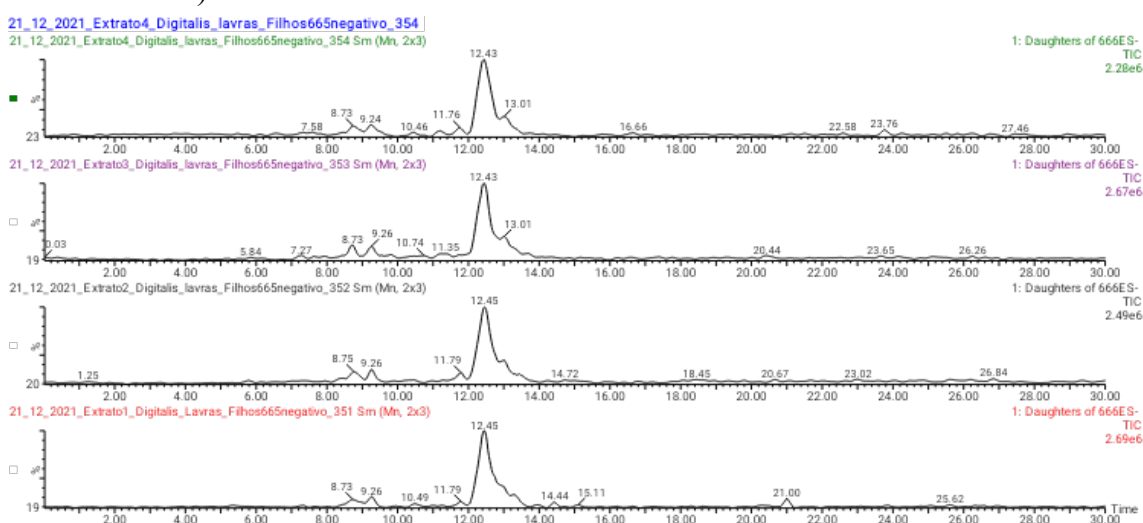
Figura 14 - Cromatogramas obtidos pelo detector UV/DAD nos extratos de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.



Fonte: Da autora (2021).

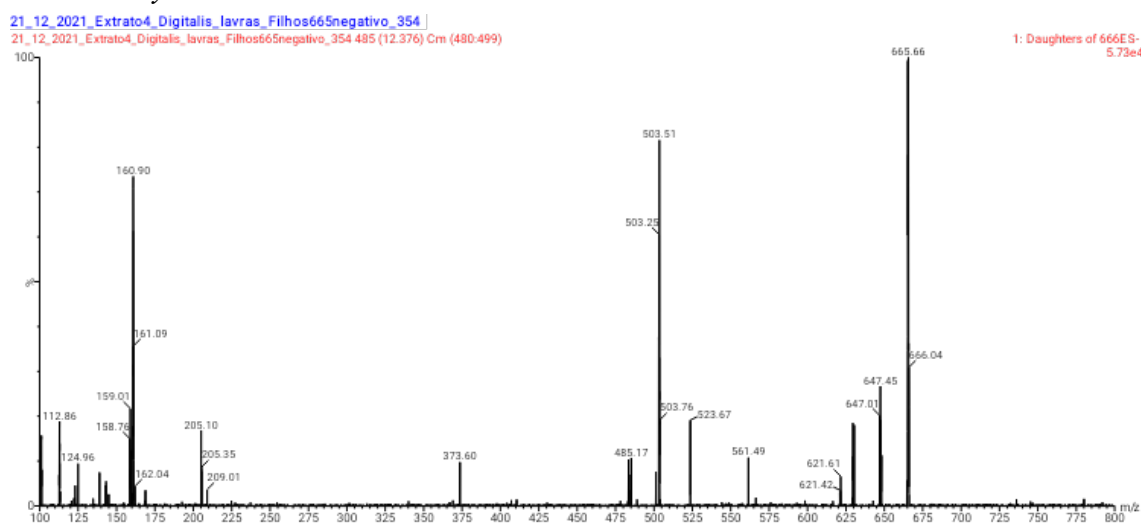
No entanto as análises via MS/MS no modo negativo, para o fragmento $[M - H]^- = 665$, evidenciou claramente um pico com tempo de retenção de 12,43 min característico da presença de GEV. O espectro de massas obtido a partir desse pico evidenciou inequivocamente a presença de GEV pela presença dos seguintes fragmentos: $[M - H]^- = 665,70$ Da, $[M - \text{Glicose} - H]^- = 503,63$ Da e $[M - \text{Glicose} - \text{Digitoxose} - H]^- = 373$ Da (FIGURAS 15 e 16).

Figura 15 - Cromatogramas obtidos pelo detector de massas MS/MS no negativo sobre monitoramento do fragmento 665 referente $[M - H]^-$ da estrutura GEV (MM= 666 Da).



Fonte: Da autora (2021).

Figura 16 - Espectro obtido, a partir do pico com tempo de retenção de 12,4 min, mostrando fragmento característico da presença de GEV nos extratos de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.



Fonte: Da autora (2021).

Desta forma, pode-se concluir, pelas análises aqui apresentadas, a presença de GEV nos extratos de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.

3.1.6 Validação do método cromatográfico

3.1.6.1 Adequabilidade do Sistema

A adequação do sistema foi verificada, por meio de cálculos de parâmetros cromatográficos das médias de seis amostras do extrato de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, comprovando que o sistema está adequado para ser utilizado quanto à avaliação da pureza do pico (P), resolução (Rs), assimetria (T), número de pratos teóricos (N), fator de retenção (k) e repetibilidade, avaliada pelo DPR do tempo de retenção, para o pico de interesse ($n=6$). Os resultados foram expressos como valor médio de seis determinações e estão apresentados na Tabela 27, juntamente com os limites recomendados por Bose (2014).

Tabela 27 - Parâmetros da adequabilidade do sistema para o pico correspondente ao GEV, empregando na condição cromatográfica estabelecida e valores recomendados por Bose (2014).

Parâmetros de adequabilidade do sistema	Média (n=6)	Valores recomendados por Bose et al., 2014
Pureza de 3 pontos (P)	0,96	-
Resolução (Rs)	1,87	>2,0
Número de pratos teóricos (N)	156158	>2000
Fator de retenção (k)	14	>2
Assimetria (T)	1,03	≤2
DPR do tempo de retenção (%)	0,04	≤ 1% p/ ≥ n =5

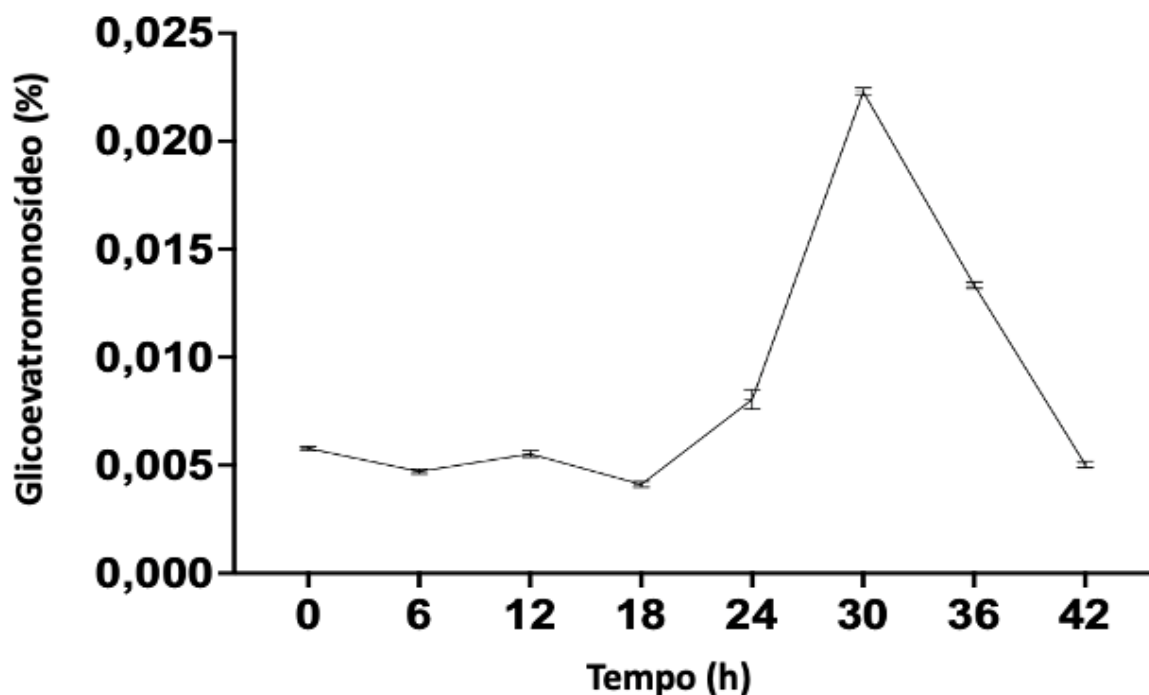
Fonte: Da autora (2021).

Nota-se que todos os valores de adequabilidade do sistema foram considerados adequados, exceto a resolução entre o pico de GEV e seu pico vizinho. Entretanto, considerando tratar-se de matriz biológica, esses valores podem ser aceitos, pois testes de adequação do sistema apresentam limites menos rigorosos para matrizes biológicas e análise de traços (BOSE, 2014). Além disso, alguns autores consideram *Rs* de 1,5 adequada, para as análises quantitativas e não recomendam valores muito superiores, que podem gerar aumento desnecessário no tempo de análise (BOSE, 2014; DONG; PAUL; GERSHANOV, 2001; MEYER, 1996).

3.1.6.2 Estabilidade Química

A estabilidade do extrato das folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* foi realizada, mantendo as amostras preparadas no carrossel do amostrador do CLAE à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), as quais foram analisadas em seis réplicas sequencialmente nos intervalos de 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 e 42 horas. Os resultados estão apresentados na Figura 17.

Figura 17 - Teor médio (n=6) de GEV durante a avaliação da estabilidade química do extrato de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.



Fonte: Da autora (2021).

De acordo com a Figura 17, é possível observar que o extrato de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* (n=6) apresenta pequena variação no teor de GEV (0,041% a 0,0058%), representando uma diferença de 0,02 μ g de GEV das 0 às 18 horas, indicando que o extrato da espécie não apresenta mais estabilidade química depois de 18 horas em que foi preparado.

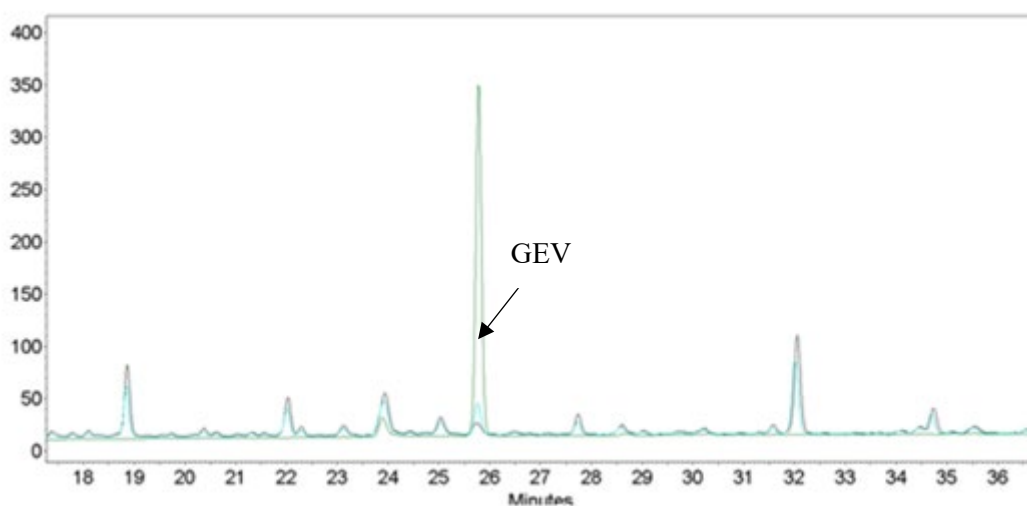
3.1.6.3 Seletividade

A caracterização do pico do GEV na amostra foi realizada pela coeluição da amostra, padrão de GEV e da amostra enriquecida com GEV (FIGURA 18). Nota-se a exata sobreposição dos picos no tempo de retenção de 25,8 min. Também não foi observada variação significativa no tempo de retenção do analito de interesse com a substância de referência (TABELA 28).

A seletividade foi também avaliada pela pureza de pico e pela similaridade espectral dos picos do padrão de GEV e amostra (TABELA 28). A pureza de pico de GEV no extrato e a similaridade espectral com o padrão foi demonstrada por meio dos cálculos matemáticos

executados pelo software EZChrom[®]. A pureza do pico foi de 98% e o valor da similaridade obtido foi de 99% para todas as amostras avaliadas ($n=6$).

Figura 18 - Overlay do perfil cromatográfico entre padrão (GEV), amostra e amostra enriquecida com GEV. Condições de preparo de amostra e condição cromatográfica vide item 2.2.5 e 2.2.6, respectivamente.



Fonte: Da autora (2021).

Tabela 28 - Resultados da seletividade para a validação analítica de GEV no extrato de *Digitalis mariana ssp. heywoodii*.

Amostra	TR (min.)	Pureza do Pico	Similaridade Espectral
Extrato de <i>Digitalis mariana ssp. heywoodii</i>	25,84	0,98	0,99
Padrão de GEV	25,85	0,93	0,999

Fonte: Da autora (2021).

A confiabilidade da condição estabelecida foi examinada por testes de adequação do sistema, compreendendo a avaliação da resolução (R_s), fator de cauda (T), números de pratos teóricos (N), fator de retenção (k). Os resultados estão apresentados na Tabela 28, juntamente com os limites recomendados por Bose (2014).

Tabela 29 - Parâmetros da adequabilidade do sistema para o pico correspondente ao GEV, empregando na condição cromatográfica estabelecida e valores recomendados por Bose (2014).

Parâmetros de adequabilidade do sistema	Média (n=6)	Valores recomendados pelo Bose (2014)
Pureza de 3 pontos (P)	0,98	-
Resolução (Rs)	1,77	>2,0
Número de pratos teóricos (N)	72.591	>2000
Fator de retenção (k)	24,84	>2
Assimetria (T)	0,92	≤2
DPR do tempo de retenção (%)	0,04	≤ 1% p/ ≥ n =5

Fonte: Da autora (2021).

Nota-se, com exceção do parâmetro resolução, que todos os valores de adequabilidade do sistema foram considerados adequados. Entretanto a resolução de 1,77 não constitui um problema, pois, de acordo com Bose (2014), valores de resolução acima de 1,5 também são aceitáveis.

3.1.6.4 Linearidade

Visando avaliar a linearidade do método, fez-se necessário estimar inicialmente a faixa de concentração dessa substância nas folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. As concentrações estimadas foram baseadas nas áreas relativas do pico correspondente à GEV na amostra comparada a de uma solução de referência (0,1 mg mL⁻¹). Com base na faixa estimada, que foi de 0,0015 a 0,0002 mg mL⁻¹ de GEV, definiu-se a faixa de trabalho de 80 a 120% da massa nominal, segundo critérios da RDC ANVISA 166/2017 (BRASIL, 2017). A faixa de trabalho, representada pelos valores de massa injetada (1,5µg a 0,2 µg) e suas respectivas áreas e desvio-padrão relativo, obtidas para as três curvas analíticas, em três dias consecutivos, estão apresentadas na Tabela 30.

Tabela 30 - Massa injetada, áreas médias ($n=3$) e desvio-padrão relativo dos pontos das curvas analíticas, obtidas nos três dias de análise. Condições cromatográficas vide item 2.2.6.

Massa inj. (μg)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)
Solução de Referência 0,1 mg mL⁻¹						
1,5	1076839	0,56	1077963	2,18	1079088	0,05
1	732262	1,32	732565	0,76	732544	1,80
0,6	440164	0,70	431080	1,46	435444	3,64
Solução de Referência 0,25 mg mL⁻¹						
0,4	262745	0,91	266388	0,17	264566	0,56
0,2	125614	1,02	125704	2,95	125657	0,03

Fonte: Da autora (2021).

Os dados da análise de regressão linear dos três dias de análises, para as três curvas analíticas individuais, estão apresentados na Tabela 31, e a curva média das três curvas obtidas para GEV está apresentada na Figura 19.

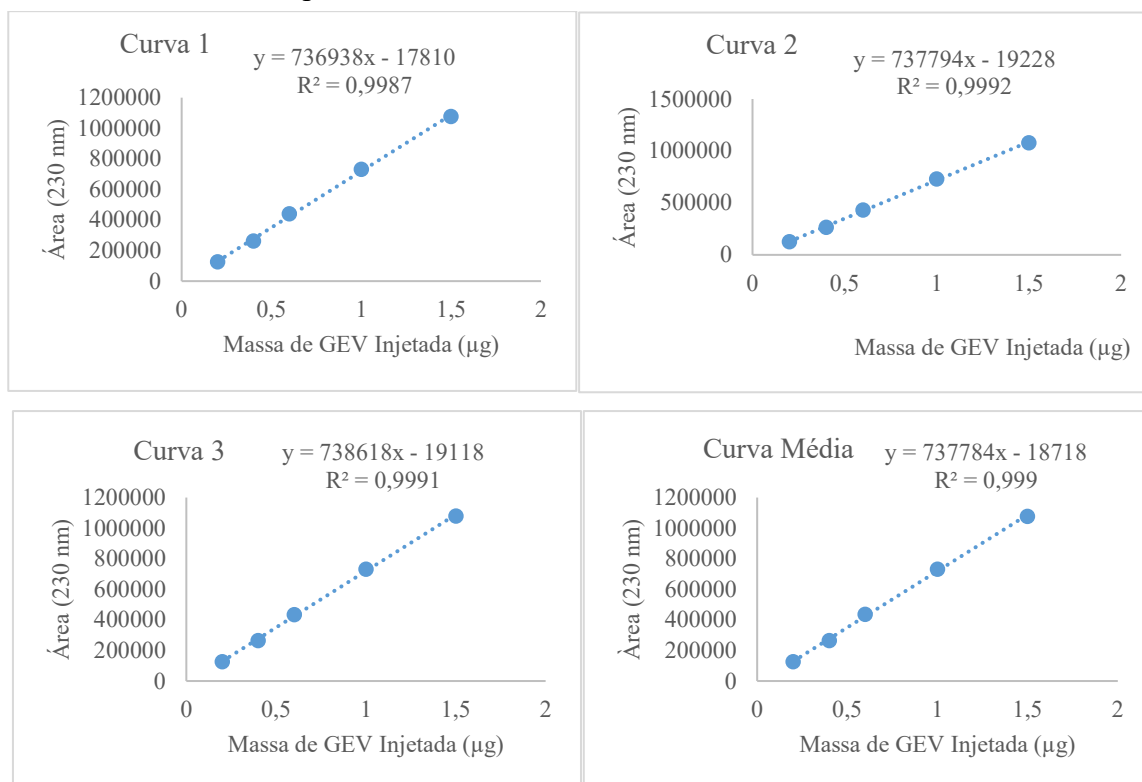
Tabela 31 - Dados de regressão linear para as curvas analíticas de GEV, em três dias consecutivos de análise.

Parâmetros estatísticos	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Faixa linear (μg)		6 a 192	
Coefficiente de determinação	0,999	0,999	0,999
Inclinação	736938	737794	738618
Erro padrão da inclinação	366,7	453,4	433,1
Valor P - inclinações das três curvas		0,996	
Intercepto com o eixo Y	-17810	-19228	-19118
Erro padrão do intercepto	133885	10230	11327
Valor P - interceptos das três curvas		0,994	

Valor P >0,05 = indica diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 19 - Curvas analíticas e média das curvas obtidas por CLAE-FR, em três dias consecutivos para GEV.



Fonte: Da autora (2021).

De acordo com o resultado da análise do *software* GraphPad Prism, pode-se concluir que as diferenças entre as inclinações são não significativas. Como as inclinações não são significativamente diferentes, é possível calcular uma inclinação para todos os dados. A inclinação agrupada é igual a 737784, conforme a equação da curva média (FIGURA 19). Pode-se concluir, além disso, que as diferenças entre os interceptos não são significativas. Como os interceptos do eixo Y não são significativamente diferentes, é possível calcular um intercepto em Y para todos os dados. A interceptação agrupada é igual a -18718, conforme a equação da curva média apresentada na (FIGURA 19).

3.1.6.5 Limites de quantificação e detecção

Inicialmente, os limites de quantificação e detecção foram determinados a partir dos parâmetros da equação das curvas analíticas. Para os cálculos, foram utilizados o desvio-padrão do intercepto e a inclinação das curvas analíticas obtidas. Obteve-se o limite médio de quantificação de 0,01 µg e de detecção de 0,004 µg (TABELA 32).

Tabela 32 - Limites de quantificação e detecção determinados com base nos parâmetros das curvas analíticas obtidas. Condições cromatográficas vide item 2.6.3.1.

Parâmetro da curva	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média
Intercepto com o eixo y	-17810	-19228	-19118	-18718
Desvio-padrão do intercepto (entre as três curvas)		789		
Inclinação	736938	737794	738618	737783
Limite de quantificação (μg)	0,01	0,01	0,01	0,01
Limite de detecção (μg)	0,004	0,004	0,004	0,004

Fonte: Da autora (2021).

Em seguida, a partir dos valores encontrados pela equação, os limites de quantificação e detecção foram determinados experimentalmente pela injeção em quintuplicata de massas decrescentes obtidas por ajustes no volume de injeção de uma solução de referência de GEV na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$. Na Tabela 33, estão apresentadas as áreas médias e os desvios-padrão relativos determinados para o limite de quantificação. O limite de quantificação foi determinado como a menor massa injetada que apresentou resultados com precisão adequada ($\text{DPR} < 3\%$).

Tabela 33 - Limites de quantificação e detecção determinados experimentalmente. Condições cromatográficas vide item 2.6.3.1.

Volume de injeção solução de GEV (μL)	Massa injetada (μg)	Área média (n=5)	DPR (%)	Relação S/N (USP)	LQ* e LD** Experimentais
10	0,1	82057	0,98	51,54	
5	0,05	42083	2,35	27,05	LQ $\geq 0,05 \mu\text{g}$
4	0,04	34727	3,45	20,26	LD $\geq 0,04 \mu\text{g}$

Fonte: Da autora (2021).

* Limite de quantificação (LQ) segue critérios da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000), $\text{DPR} \leq 3\%$. ** Limite de detecção (LD) segue critérios RDC 166/2017 (BRASIL, 2017), relação $\text{S/N} \geq 2:1$. Valor mínimo para S/N corresponde a $\leq 20,00$ (esse valor de referência foi gerado pelo *software* OpenLab Exchrom®).

Comparando os resultados obtidos pelos parâmetros da curva analítica (LQ= $0,01 \mu\text{g}$ e LD= $0,004 \mu\text{g}$) e experimentalmente (LQ= $0,05 \mu\text{g}$ e LD= $0,04 \mu\text{g}$), observa-se que os valores encontrados para LQ da curva analítica e experimental são distintos. Recomenda-se seguir os valores experimentais.

3.1.6.6 Precisão

A precisão intermediária e a repetibilidade foram avaliadas por intermédio de seis (6) determinações de soluções realizadas a 100% de concentração, sendo preparadas, conforme descrito nos itens 2.2.5 e 2.2.6. A análise foi realizada com base na repetitividade das áreas de seis amostras do extrato de *Digitalis mariana ssp. heywoodii* (TABELA 34).

Tabela 34 - Teor de GEV e desvio-padrão relativo observados na determinação da repetibilidade de amostras de *Digitalis mariana ssp. heywoodii* na condição cromatográfica estabelecida.

Amostras	Teor GEV ($\mu\text{g}/100$ g de folha seca)
1	33,02
2	34,40
3	33,19
4	32,99
5	33,88
6	32,89
Área média	33,40
Desvio-padrão	0,608
DPR (%)	1,82

Fonte: Da autora (2021).

Condições de preparo de amostra e condição cromatográfica vide item 2.2.5 e 2.2.6, respectivamente.

Os resultados obtidos pelo mesmo analista, no mesmo dia quanto às mesmas condições, proporcionaram um DPR das áreas de 1,82%, estando em conformidade com os critérios da ANVISA (INMETRO, 2014), demonstrando concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo.

Na precisão intermediária, foram analisadas as mesmas quantidades de amostras, obtendo DPR das áreas de 1,75 por analista diferente, conforme apresentado na Tabela 35, representando a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes de análise (INMETRO, 2014).

Para ambos os estudos, os valores de desvio-padrões relativos foram inferiores a 2, demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão. Segundo a Resolução 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017), os desvio-padrão relativos, para a precisão, não devem exceder 5%. Assim, pode-se observar que os valores encontrados estão de acordo com o preconizado para esse parâmetro nos dois níveis avaliados.

Tabela 35 - Teor de GEV e desvio-padrão relativo observados na determinação da precisão intermediária de amostras de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* na condição cromatográfica estabelecida.

Amostras	Teor GEV ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ de folha seca)
1	28,22
2	26,87
3	27,21
4	27,41
5	27,53-
6	28,13
7	28,22
8	28,13
9	27,21
10	28,30
11	27,67
12	27,57
Área média	27,70
Desvio padrão	0,48
DPR (%)	1,75

Fonte: Da autora (2021).

Condições de preparo de amostra e condição cromatográfica vide item 2.2.5 e 2.2.6, respectivamente.

3.1.6.7 Exatidão

Os testes de recuperação foram realizados pela fortificação das folhas pulverizadas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* com quantidades conhecidas do padrão de referência (GEV), no nível mínimo de concentração e em triplicata. Para tanto, foi preparada uma solução metanólica de GEV ($21,6\ \mu\text{g mL}^{-1}$). Um volume de $500\ \mu\text{L}$ dessa solução ($10,8\ \mu\text{g}$) foi adicionado diretamente em $0,125\ \text{mg}$ das folhas pulverizadas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, conforme discriminado na Tabela 36.

Após a fortificação, soluções foram preparadas e analisadas como descrito no item 2.2.6. Amostras das folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* não fortificadas ($n = 3$) também foram preparadas para a determinação da massa recuperada.

A recuperação foi determinada empregando-se a equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \text{massa experimental} \times 100 / \text{massa teórica}$$

A Tabela 36 apresenta o resultado do ensaio de recuperação para GEV cuja recuperação média de GEV ao nível 1 foi de 111%. Segundo a AOAC (2000) e Snyder *et al.* (1997), os

valores de recuperação devem estar entre 98 a 102% e 99 a 101%, respectivamente. No entanto a AOAC estabelece faixas de recuperação em função da concentração do analito na amostra em estudo (AOAC, 2000). Para analitos com concentrações de 0,1%, 0,01%, preconizam-se taxas de recuperação de 90 a 108% e 85 a 110%, respectivamente. Portanto pode-se constatar que o valor de recuperação obtido para essa substância atende os limites estabelecidos pelas literaturas.

Tabela 36 - Valores de recuperação de GEV (média, n=3).

Nível	Solução de GEV ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume (μL) da solução de GEV adicionada às folhas	Massa teórica de GEV adicionada (μg)	Massa teórica de GEV injetada ^a (μg)	Massa de GEV na amostra não fortificada (μg)	Massa teórica de GEV na amostra fortificada ^b (μg)	Massa experimental de GEV na amostra fortificada ^c (μg)	Recuperação de GEV ^d (%)	DPR (%)
1	21,6	500	10,8	0,108	0,241	0,349	0,387	111	7,85

Fonte: Da autora (2021).

^a Quantidade (μg) de GEV na amostra fortificada correspondente a 10 μL de amostra injetada.

^b Quantidade (μg) de GEV na amostra não fortificada + Quantidade (μg) de GEV injetado = Quantidade teórica de GEV.

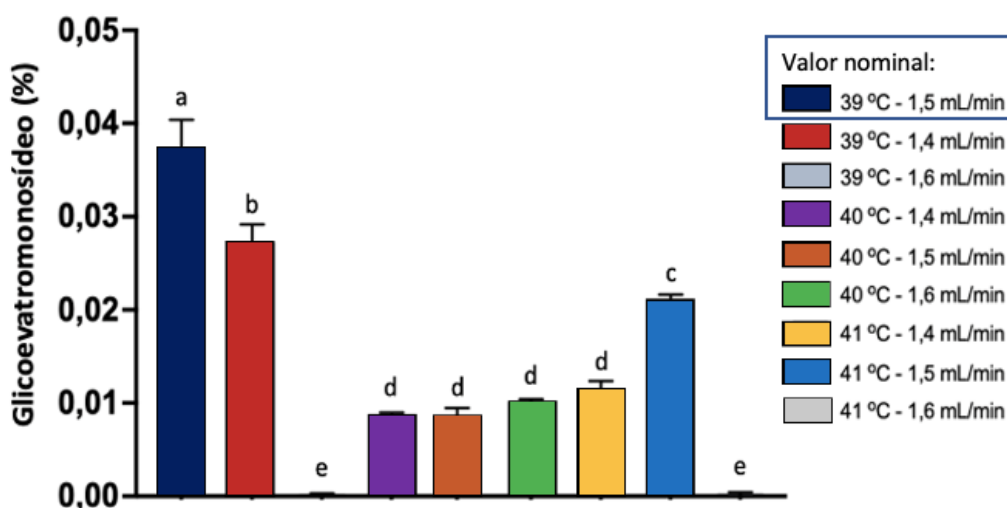
^c Quantidade (μg) de GEV determinada experimentalmente nas amostras fortificadas.

^d % recuperação = (quantidade experimental \div quantidade teórica) x 10.

3.1.6.8 Robustez

A robustez do método foi avaliada por variações nas condições de análise cromatográfica: temperatura da coluna (39°C, 40°C e 41°C) e fluxo (1,4, 1,5 e 1,6 mL min⁻¹). A Figura 20 apresenta os valores obtidos no estudo de robustez do método para o extrato das folhas de *Digitalis mariana ssp. heywoodii*.

Figura 20 - Influência da variação na condição cromatográfica na robustez do método para o extrato das folhas de *Digitalis mariana ssp. heywoodii* (n=6). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05)



Fonte: Da autora (2021).

De acordo com a Figura 20, é possível observar que pequenas variações na temperatura e fluxo geram diferenças no teor de GEV. Comparando com a condição nominal (40 °C, 1,5 mL/min), observa-se que pequenas variações no fluxo não causam alteração da resposta cromatográfica. Entretanto variações simultâneas, nas condições de temperatura e fluxo, só não causam alteração na condição de 41°C, 1,4 mL/min. Nas demais, independente do fluxo, alterações na temperatura da coluna comprometem a confiabilidade dos resultados.

Analisando as modificações na temperatura da coluna e o fluxo de forma individual, observa-se que o teor de GEV foi superior à temperatura de 40°C no fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Para o fluxo de 1,4 mL min⁻¹ à temperatura da coluna a 39 °C, 40 °C e 41 °C e fluxo 1,6 mL min⁻¹ a 40 °C, não houve diferença significativa, segundo o Scott-Knott, (p>0,05). Desta

forma, tais resultados demonstram que o método não é robusto, no que diz respeito a variações deliberadas na temperatura da coluna e robusto, quando ocorre variação de $\pm 0,1$ mL/min no fluxo da coluna.

3.2 Determinação do crescimento vegetal

As malhas coloridas influenciaram significativamente o crescimento de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, após 120 dias de cultivo, conforme Tabela 37.

Tabela 37 - Número de folhas (NF), comprimento de raiz (CR), massa seca de folha (MSF), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST), relação raiz/parte aérea (R/PA) e área foliar de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* submetidas a diferentes condições de luminosidade com 120 dias. Lavras, MG, 2021.

Malhas Coloridas	NF (g)	CR (cm)	MSF (g)	MSR (g)	MST (g)	PA/R	Área Foliar (cm ²)
Azul	30,00±6,9a	54,00±4,8a	12,69±1,9a	4,04±0,5a	19,83±2,4a	0,41±0,07a	46,97±5,1a
Vermelha	28,45±6,7a	50,85±6,6b	11,42±3,1a	3,55±0,7b	18,39±3,5a	0,41±0,08a	35,13±3,2b
Preta	26,95±7,0a	48,85±6,6b	10,14±3,4b	3,48±0,9b	15,99±4,5b	0,40±0,07a	33,26±3,4b
Pleno sol	25,95±5,8a	40,70±6,5c	9,68±3,1b	3,38±0,9b	16,89±4,1b	0,36±0,19b	28,54±4,1b
CV (%)	25,70	12,66	19,44	21,35	17,06	10,45	12,14

Fonte: Da autora (2021).

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 37, é possível observar que o número de folhas não diferiu entre as malhas e o cultivo a pleno sol. No entanto o comprimento de raiz foi maior sob malha azul (54 cm) e menor a pleno sol (40,70 cm).

A qualidade da luz influenciou significativamente ($p < 0,05$) o crescimento da raiz, em comprimento na tela de cor azul (54,00 cm), não havendo diferença significativa no desenvolvimento das plantas cultivadas sob a tela vermelha (50,85 cm) e preta (48,85 cm), sendo o seu crescimento a pleno sol (40,70 cm) menor e estatisticamente diferentes dos outros tratamentos (TABELA 37). Isso indica uma alocação preferencial de biomassa para a parte aérea da planta.

Tais características de maior comprimento de raiz, de acordo com Alves *et al.* (2018), as plantas com sistemas radiculares mais desenvolvidos em determinada condição têm maior habilidade de aclimação, pois podem absorver maior quantidade de água e nutrientes,

garantindo maior capacidade para suportar maiores taxas de fotossíntese e transpiração que ocorrem nesses ambientes.

O cultivo de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* alcançou o maior acúmulo de matéria seca de folha (12,69 g), raiz (4,04 g) e total (19,83 g), no cultivo de malha azul, seguido da malha vermelha.

Em relação à massa seca de raiz, a tela azul também apresentou maior rendimento (4,04g), seguido da tela vermelha, preta e cultivo a pleno sol com 3,55 g, 3,48 g e 3,38g respectivamente, sendo esses três tratamentos estatisticamente iguais. Esses resultados corroboram com os resultados apresentados por Figueiredo *et al.* (2018), Martins *et al.* (2008), Oliveira *et al.* (2009) e Rosal *et al.* (2008), que também encontraram maior matéria seca de raiz sob malha azul.

A produção de matéria seca variou em razão das condições de cultivo. Plantas cultivadas a pleno sol obtiveram menores ganhos de matérias secas foliar e total quando comparadas com aquelas cultivadas sob sombreamento com telas da cor azul, vermelha e preta (TABELA 37).

A malha azul proporcionou a maior quantidade de matéria seca de folha (12,69 g), seguida da vermelha com 11,42 g. Com valores inferiores e estatisticamente diferentes da tela azul e vermelha, tem-se a tela preta com 10,14 g de matéria seca de folha e as plantas cultivadas a pleno sol com 9,68 g, respectivamente, sendo esses dois tratamentos significativamente iguais.

As plantas cultivadas sob tela azul e vermelha acumularam maior quantidade de matéria seca de folhas, pois normalmente esses dois tipos de espectro de luz têm maior impacto no crescimento das plantas, pois são as principais fontes de assimilação fotossintética de CO₂ (NOORHOSSEINI; FALLAHI; DAMALAS, 2020).

As plantas cultivadas sob luz azul estão envolvidas em uma ampla gama de processos, como fototropismo, fotomorfogênese, abertura dos estômatos e funcionamento do aparato fotossintético. Essa luz possui menor comprimento de onda e, por consequência, maior energia utilizada como um sinal que fornece informações sobre o ambiente; tais informações são traduzidas em processos metabólicos que permitem às plantas alterarem seu crescimento e desenvolvimento (DOUSSEAU *et al.*, 2017). Segundo Rolim *et al.* (2016), esse sinal elétrico estimula a atividade fotossintética, sendo responsável pela manutenção de um potencial elétrico nas membranas das células guardas e pela abertura estomática, resultando no aumento da concentração do CO₂ dentro do mesófilo, gerando maior teor de sítio e maior conteúdo de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase / oxigenase (RuBisCO) (ESKINS; JIANG; SHIBLES, 1999; LEONG; ANDERSON, 1984; STITT; SCHULZE, 1994).

Em relação à luz vermelha, isso é explicado pela ativação da síntese das auxinas pelos comprimentos de onda do espectro vermelho e vermelho distante que são intensificados na malha vermelha (ALVES *et al.*, 2018). Taiz *et al.* (2017) mencionaram que as faixas das regiões do espectro relativo à faixa do vermelho são os limites do espectro que exercem efeito no crescimento das plantas. O aumento da relação entre essas faixas, proporcionada pelos filtros das malhas vermelhas, pode estimular maior conversão do fitocromo da forma ativa para a forma inativa (WHITELAM; HALLIDAY, 2007), causando redução da relação entre a forma ativa e o fitocromo total, o que causaria maior produção de biomassa de folhas e caules (MELO; ALVARENGA, 2009).

Hossain *et al.* (2009) afirmaram que a luz vermelha pode causar um grande aumento na expressão de um gene que codifica uma enzima-chave na síntese da giberelina. Anand *et al.* (2019) explica que isto ocorre em função da transferência de luz do espectro nessa faixa da cor ser maior, promovendo, assim, melhor qualidade de luz e luz difusa e maior desenvolvimento vegetativo, enraizamento e produção.

Verma *et al.* (2018) avaliaram os parâmetros de crescimento (número de folhas, comprimento e raiz, largura da folha, largura dos estômatos, área foliar, largura e comprimento de tricomas) de *Digitalis purpurea*, sob ambiente controlado e investigaram a influência de diferentes qualidades de luz LED (vermelho, azul, fluorescente (controle) e vermelho e azul combinado). Os valores observados para esses parâmetros por Verma *et al.* (2018) indicaram que plantas desenvolvidas sob luz vermelha e azul foram superiores em comparação ao controle. Silva (2017), utilizando a combinação de comprimento de onda azul e vermelho, obteve maiores valores na produção de biomassa da parte aérea de *Digitalis mariana* ssp *heywoodii*.

Diversos estudos também apontaram a influência da luz vermelha monocromática como indutora no crescimento da parte aérea de plântulas micropropagadas (COELHO *et al.*, 2021; HUNG *et al.*, 2016; JEONG; SIVANESAN, 2018; SILVA *et al.*, 2017) e, em malhas de cor vermelha (ALMEIDA; CALABONI; RODRIGUES, 2016; COSTA *et al.*, 2018; HENRIQUE *et al.*, 2011; HOSSEINI; ZARE MEHRJERDI; ALINIAEIFARD, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2014) e, também, o maior desenvolvimento de folhas, gerando maior biomassa em plantas medicinais cultivadas sob malha fotoconversora azul (OLIVEIRA *et al.*, 2009, 2016; ROSAL *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2011a, 2014). Resultados esses que corroboram com os maiores valores encontrados de biomassa da parte aérea para a malha azul (30 g) e vermelha (28,45 g) neste trabalho (TABELA 37).

Os menores valores de crescimento (matéria seca de folha, matéria seca de raiz, comprimento de raiz) de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* foram encontrados para as plantas cultivadas a pleno sol. Tais resultados também são amplamente verificados na literatura, em plantas medicinais cultivadas a pleno sol, em relação a plantas cultivadas sob malhas coloridas (ALVES *et al.*, 2018; HOLCMAN; SENTELHAS, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010, 2013). Esse efeito é resultado da intensidade luminosa excessiva, capaz de gerar danos aos tecidos fotossintetizantes (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009; KHAN *et al.*, 2018).

Com esses resultados, verifica-se uma relação entre o desenvolvimento da área foliar e a biomassa seca, principalmente da parte aérea. Logo as plantas cultivadas, em ambiente parcialmente sombreado, aparentemente, investiram maior quantidade de fotoassimilados, em especial, na parte aérea que aquelas cultivadas em pleno sol. Respostas semelhantes foram observadas, em várias espécies, cuja característica de crescimento foi promovida pela condição de sombreamento (ALVES *et al.*, 2018; CORRÊA *et al.*, 2012; HENRIQUE *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2010, 2012, 2013, 2014).

Analisando a relação parte aérea/raiz, houve diferença estatística das plantas cultivadas a pleno sol comparadas com o crescimento sob malhas coloridas que não diferiram entre si, conforme Tabela 37.

A Figura 21 apresenta as mudas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* obtidas, após 120 dias de cultivo a pleno-sol, telas pretas, vermelhas e azuis.

Figura 21 - Plantas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* cultivadas a pleno sol, malha azul, vermelha e preta, após 120 dias. Lavras, MG, 2021.



Fonte: Da autora (2021).

A análise geral dos dados mostra que, em razão da sua plasticidade morfológica e fisiológica, as plantas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* se ajustam às condições de luminosidade (TAIZ *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018) e podem utilizar seus fotoassimilados, para o crescimento do caule ao custo de desenvolver folhas e também suas raízes (PARK; RUNKLE, 2017).

Na Tabela 37, também é apresentada a área foliar das folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* submetidas a diferentes malhas coloridas após 120 dias. As folhas das plantas cultivadas sob malha azul apresentaram a maior área foliar (46,97 cm²), sendo estatisticamente diferente das telas vermelha (35,97 cm²), preta (33,26 cm²) e às plantas cultivadas a pleno sol (28,54 cm²). O incremento da área foliar, em ambientes com sombreamento, é uma das maneiras da planta aumentar a superfície fotossintética, assegurando melhor aproveitamento das baixas intensidades luminosas e, conseqüentemente, compensando as baixas taxas fotossintéticas por unidade de área foliar, que é uma característica das folhas de sombra (BRANT *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2011b). Plantas submetidas a ambientes sombreados

possuem maior expansão foliar, para captar maior quantidade de energia disponível e, assim, garantir um processo fotossintético mais eficiente (COELHO *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2012; MEIRA; MARTINS; MANGANOTTI, 2012; SABBI; ÂNGELO; BOEGER, 2010).

De acordo com Taiz *et al.* (2017), essa resposta é uma estratégia adaptativa, que pode proporcionar melhor absorção de luz e permitir maior eficiência fotossintética, para maior ganho de carbono, em consequência da maior área foliar para a absorção da energia luminosa.

Esses resultados se assemelham aos observados por Souza *et al.* (2010), que registraram os maiores valores de área foliar total (AFT) das plantas de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae - guaco) sob as malhas cinza e azul. E a pesquisa de Centofante (2020) que trabalhou com diferentes qualidades de luz, na região do vermelho e azul, para *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. (Myrtaceae - guabiroba do campo) em cultivo *in vitro*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira *et al.* (2009) para *Artemisia vulgaris* L. (Asteraceae - camomila comum), *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae - alfavaca cravo) (MARTINS *et al.*, 2009), *Mentha piperita* L. (Lamiaceae - hortelã pimenta) (SOUZA *et al.*, 2012), *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae - melissa) (OLIVEIRA *et al.*, 2016), com maiores valores de área foliar também obtidos nas plantas cultivadas sobre tela azul.

O aumento na expansão das folhas cultivadas sob malha azul foi claramente vantajoso ao crescimento das plantas, pois conduziu a melhores intercepções de luz e, em consequência, à maior taxa de crescimento (SOUZA *et al.*, 2011a). Apesar das variações de área foliar normalmente estarem associadas a diferenças de intensidade luminosa, para plantas jovens de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, infere-se que essa característica foi modulada pela qualidade de luz, ou seja, pela maior área foliar estimulada pela tela de cor azul, deduzindo-se que folhas cultivadas sob tela azul apresentam aparelho assimilador de CO₂ mais aperfeiçoado.

3.3 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes

A quantificação de pigmentos fotossintetizantes das mudas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, após quatro meses de implantação do experimento, avaliando-se clorofila *a* e *b*, clorofila total, relação *a/b* e carotenoides, responderam significativamente aos tratamentos das telas fotoconversoras e pleno sol (TABELA 38).

Tabela 38 - Clorofila *a* e *b*, clorofila total, carotenoides e relação *a/b* de plantas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* submetidas a diferentes condições de luminosidade com 120 dias. Lavras, MG, 2021.

Tratamento	Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹)	Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹)	Clorofila total (mg g ⁻¹)	Carotenoides (mg g ⁻¹)	Relação <i>a/b</i>
Tela Azul	1,88±0,04 a	0,48±0,02 a	2,37±0,02 a	0,49±0,01 a	3,84±0,1 a
Tela Vermelha	1,69±0,04 b	0,42±0,02 b	2,01±0,02 b	0,44±0,02 b	3,75±0,1 a
Tela Preta	1,34±0,03 c	0,40±0,02 c	1,75±0,01 c	0,38±0,01 c	3,32±0,1 b
Pleno-sol	0,98±0,03 d	0,34±0,01 d	1,32±0,01 d	0,34±0,02 d	2,85±0,2 c
CV(%)	2,00	2,81	2,08	1,40	4,20

Fonte: Da autora (2021).

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação à clorofila *a*, é possível observar que os maiores valores foram observados sob malha azul (1,88 mg g⁻¹), seguido do tratamento com tela vermelha (1,69 mg g⁻¹), tela preta (1,34 mg g⁻¹) e pleno sol (0,98 mg g⁻¹). O mesmo foi observado, para a clorofila *b* (0,48 mg g⁻¹), (0,42 mg g⁻¹), (0,40 mg g⁻¹) e (0,34 mg g⁻¹), clorofila total (2,37 mg g⁻¹), (2,01 mg g⁻¹), (1,75 mg g⁻¹) e (1,32 mg g⁻¹), carotenoides (0,49 mg g⁻¹), (0,44 mg g⁻¹), (0,38 mg g⁻¹) e (0,34 mg g⁻¹) e clorofila total (2,37 mg g⁻¹), (2,01 mg g⁻¹), (1,75 mg g⁻¹) e (1,32 mg g⁻¹), respectivamente, com todos os tratamentos diferindo entre si (TABELA 38).

Encontrar maiores quantidades de pigmentos fotossintetizantes, em plantas cultivadas sob sombreamento, comparadas com plantas cultivadas a pleno sol, pode ser observado, pois muitas espécies de plantas são capazes de alterar a composição de seus aparelhos fotossintéticos, para otimizar a fotossíntese, em relação ao ambiente luminoso, em que estão crescendo (ANDERSON; CHOW; PARK, 1995; HE *et al.*, 2018; MURCHIE; HORTON, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2016; YIN; JOHNSON, 2000).

Folhas de plantas sombreadas são mais finas e possuem cloroplastos mais ricos em clorofila. Desta forma, folhas “de sombra” investem maior energia na produção de pigmentos responsáveis pela captação de energia radiante, permitindo uma otimização na utilização da intensidade de luz incidente (KATEROVA; TODOROVA; SERGIEV, 2017).

Embora existam variações entre as espécies, de modo geral, plantas cultivadas em ambientes sombreados tendem a aumentar a quantidade total de proteínas de ligação à clorofila, em relação às proteínas de transporte de elétrons e enzimas do ciclo de Calvin, existindo um equilíbrio entre captura e uso da luz. Isso garante que as proteínas e enzimas de transporte de

elétrons operem com eficiência máxima. Todo esse processo pode ser definido como uma aclimação fotossintética (CENTOFANTE, 2020; EVANS, 1996).

Taiz *et al.* (2017) explicaram que as folhas que recebem algum tipo de sombreamento aumentam a captura de luz, por terem mais clorofila total por centro de reação, ocasionada pela razão mais alta entre as clorofilas *a* e *b* e pelas folhas dessa camada apresentarem lâminas geralmente mais finas que as que ficam expostas ao sol.

Nota-se que a clorofila *a*, *b* e os carotenoides são mais expressivos nas plantas desenvolvidas sob a tela azul, quando comparadas com as mesmas cultivadas a pleno sol (0,98 mg g⁻¹). Verma *et al.* (2018), ao investigarem a influência de diferentes qualidades de luz LED (vermelho, azul, fluorescente (controle) e combinação de vermelho e azul), em plantas de *Digitalis purpurea*, também, encontraram valores maiores de clorofila *a* em plantas desenvolvidas sobre luz azul em comparação ao controle.

Resultados semelhantes também foram encontrados para *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker (Guaco - Asteraceae), cultivada em tela azul com maiores valores de clorofila *a* e *b*, quando comparadas com as mesmas cultivadas a pleno sol (SOUZA *et al.*, 2010), *Mikania laevigata* (SOUZA *et al.*, 2011b), *Achillea millefolium* L. (Mil folhas - Asteraceae) (PINTO *et al.*, 2014) e *Piper longum* L. (pimenta longa - Piperaceae) (LIMA *et al.*, 2017).

Os resultados para luz azul são condizentes com as referências encontradas, uma vez que esses espectros são primordialmente absorvidos pela clorofila *a*, responsável pela eficiência fotossintética. Em alguns estudos, a luz azul é referida como a principal indutora do maior acúmulo de clorofila, promovendo a síntese de proteínas que participam do aparato fotossintético e o desenvolvimento dos plastídeos do cloroplasto (HOGEWONING *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SAEBO; KREKLING; APPELGREN, 1995; SOAVE; SILVA, 1993; SUN; NISHIO; VOGELMANN, 1998).

Além disso, observa-se que as plantas cultivadas sob todos os tratamentos pareceram sintetizar mais clorofila *a*, pelo fato do seu espectro ser mais amplo, em comparação com o da clorofila *b*, visto que essa é a molécula que torna possível a fotossíntese (ARTHURS; STAMPS; GIGLIA, 2013; LIN *et al.*, 2013).

As plantas cultivadas sob telas coloridas, azul (3,84), vermelha (3,32), preta (3,75) apresentaram maior razão clorofila *a/b* que aquelas cultivadas a pleno sol (2,85) (TABELA 38). A razão clorofila *a/b*, de maneira geral, tende a diminuir com a redução da intensidade luminosa (LIMA *et al.*, 2020). Como o oposto foi verificado, é possível que a maior proporção relativa de clorofila *a*, nos ambientes sombreados, possa estar associado à sua degradação mais lenta em relação à clorofila *b* (YANG *et al.*, 2019).

Quanto aos teores de carotenoides, de acordo com Alvarenga *et al.* (2015), estão relacionados à dissipação da energia térmica pelo ciclo de xantofila, e os maiores valores foram obtidos nas plantas cultivadas sob tela azul (TABELA 38). Resultados semelhantes também foram encontrados para *Achillea millefolium* (PINTO *et al.*, 2014) e *Piper longum* (pimenta longa - Piperaceae) (LIMA *et al.*, 2017). Maiores valores de carotenoides encontrados, para as plantas cultivadas sobre tela azul, podem ter favorecido quantidades maiores das clorofilas *a* e *b* na mesma tela, visto que esses são pigmentos que funcionam como fotoprotetores, por meio da rápida extinção dos estados excitados da clorofila, protegendo-a da foto-oxidação (TAIZ *et al.*, 2017).

A diferença significativa encontrada entre os teores de clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenoides, bem como na relação *a/b* nas plantas de *Digitalis mariana ssp. heywoodii*, evidenciam que essa espécie dispõe de diferentes estratégias no acúmulo e uso dos pigmentos fotossintéticos em telas coloridas quando comparadas com o desenvolvimento a pleno sol.

3.4 Determinação de proteínas totais

Na Tabela 39, observa-se o efeito dos diferentes tratamentos (telas azul, vermelha, preta e pleno sol), no teor de proteínas totais (mg mL^{-1}) de folhas jovens de *Digitalis mariana ssp. heywoodii* e na produção de cardenolídeos totais ($\text{g}/100 \text{ g}$ de matéria seca) e GEV ($\mu\text{g}/100\text{g}$ de material vegetal-biomassa seca)

Tabela 39 - Efeito dos diferentes tratamentos, tela azul, vermelha e preta, no teor de proteínas solúveis totais (mg mL^{-1}) e na produção de cardenolídeos totais ($\text{g}/100 \text{ g}$ de folha seca) e GEV ($\mu\text{g}/100\text{g}$ de folha seca). Lavras, MG, 2020.

Tratamento	Proteína Solúveis Totais (mg mL^{-1}) MSF	Cardenolídeos Totais ($\text{g}/100\text{g}$)	GEV ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Azul	0,118±0,003 a	2,29±0,12 a	26,0±0,29 a
Vermelha	0,088±0,004 b	2,33±0,04 a	22,3±0,26 b
Preta	0,080±0,003 c	1,69±0,17 b	14,5±0,13 c
Pleno Sol	0,068±0,001 d	1,56±0,17 b	13,9±0,21 d
CV (%)	1,91	6,93	1,21

Fonte: Da autora (2021).

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de proteína foliar das plantas de *Digitalis mariana ssp. heywoodii* foram significativamente diferentes, ao nível de 95% de confiabilidade, para todos os tratamentos

avaliados. Verifica-se que plantas cultivadas sobre a tela azul apresentaram maiores teores de proteína (0,118 mg mL⁻¹), seguida da tela vermelha (0,088 mg mL⁻¹) e tela preta (0,080 mg mL⁻¹), quando comparadas com as plantas jovens cultivadas a pleno sol, que obtiveram o menor teor de proteína solúvel (0,069 mg mL⁻¹).

Resultado semelhante foi encontrado por Vieira (2017), que, avaliando o teor de proteína total de oro-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller - Cactaceae), cultivado sob diferentes cores de telas fotoconversoras, em 80 dias de cultivo, encontraram maior teor de proteína em plantas cultivadas sobre tela azul.

Queiroz *et al.* (2015), verificando o teor de proteínas totais nas folhas de *Pereskia aculeata* Miller, observaram que a condição sombreada obteve 74% a mais de proteína, em relação a plantas sem sombreamento, evidenciando que a espécie apresentou modificações metabólicas, para ajuste e manutenção do desenvolvimento, em função das condições de intensidade luminosa.

Maiores valores de proteína no tratamento com luz azul podem ser verificados, pois a qualidade luminosa interfere na expressão das proteínas nos tilacoides e a luz azul pode controlar a integridade das proteínas do cloroplasto elevando o desempenho fotossintético (MUNEER *et al.*, 2014; QUEIROZ *et al.*, 2015). Verifica-se-se que a proteômica da membrana tilacoide é uma excelente abordagem, para estabelecer o número e a identidade das proteínas, localizadas nesse subcompartimento, nos complexos pigmento-multiproteínas e avaliar o impacto da qualidade e intensidade da luz para aumentar o metabolismo fotossintético e outros fatores fisiológicos das plantas (HIPPLER *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2015).

Esse resultado pode indicar que a qualidade da luz influencia na produção de proteínas, em plantas jovens de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, demonstrando que a subespécie ajusta seu metabolismo em função da qualidade luminosa.

3.5 Análises quantitativas de cardenólídeos e GEV

De acordo com a Tabela 39, os tratamentos apresentaram diferença significativa, de acordo com o teste de Scott-Knott (5%). Em relação aos cardenólídeos totais, as telas azul e vermelha não apresentaram diferença significativa, ao nível de 5% de significância (2,29% e 2,33%, respectivamente). Entretanto os maiores teores de GEV foram encontrados apenas em plantas cultivadas sob tela azul (26,0 µg/100g de material vegetal).

Verma *et al.* (2018), ao investigarem a influência de diferentes qualidades de luz LED (vermelho, azul, fluorescente (controle) e combinações vermelho e azul), em plantas de

Digitalis purpurea cultivadas *in vitro*, também, observaram que o acúmulo de cardenólidos foi significativamente influenciado pela luz azul e vermelha. A combinação de luz azul e vermelha produziu a maior quantidade de digitoxina (0,427 mg g⁻¹) e digoxina (0,16 mg g⁻¹), seguido por plantas tratadas com LEDs azuis, em que as quantidades registradas de digitoxina e digoxina foram 0,313 mg g⁻¹ e 0,100 mg g⁻¹, respectivamente. O maior acúmulo de cardenólido também foi relatado em *Digitalis lanata* por Ohlsson, Bjork e Gatenbeck (1983), sob luz azul e vermelha. Silva (2017), estudando as condições de luminosidade *in vitro*, para *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, também, observou que a combinação dos espectros de luz no azul e no vermelho promoveu maior teor de cardenólidos totais. O presente estudo de cultivo *in vivo* sob malhas coloridas com *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* corrobora aos achados de Silva (2017), em estudos de cultura *in vitro*, que essas duas cores de luz (azul e vermelho) são cruciais para favorecer a síntese de cardenólidos.

Silva (2017) também observou que a combinação de comprimento de onda azul e vermelho contribuiu para o aumento no teor de cardenólido total. Scheibner *et al.* (1987) observaram que a irradiação com luz azul e/ou vermelha produziu maiores teores de cardenólidos em embriões somáticos de *Digitalis lanata*, concluindo que os fotorreceptores de luz azul e fitocromo estão envolvidos na regulação da biossíntese e acúmulo de cardenólidos. Por outro lado, é um fato comumente aceito que a intensidade da luz pode influenciar positivamente o acúmulo de fitoquímicos (CACHO *et al.*, 1999; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; HAGIMORI; MATSUMOTO; OBI, 1982; LUCKNER; WICHTL, 2000).

Em razão do sinal elétrico, que estimula a atividade fotossintética, é responsável pela manutenção de um potencial, nas membranas das células guardas e pela abertura estomática, resultando no aumento da concentração do CO₂ dentro do mesófilo (ROLIM *et al.*, 2016), gerando maior teor de sítio e maior conteúdo de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase / oxigenase (RuBisCO) (ESKINS; JIANG; SHIBLES, 1999; LEONG; ANDERSON, 1984; STITT; SCHULZE, 1994). Além disso, variações no espectro de luz podem causar flutuações no conteúdo de metabólitos secundários (XIE *et al.*, 2006). De acordo com a Tabela 39, também observa - se que plantas não cultivadas sob malhas coloridas apresentaram os menores valores para cardenólidos e GEV.

Até o momento não foram encontrados, na literatura disponível, trabalhos avaliando o efeito de malhas fotoconversoras no acúmulo de GEV. São encontrados poucos trabalhos associados à influência da qualidade de luz a cardenólidos totais para o gênero *Digitalis* (SILVA, 2017; VERMA *et al.*, 2018), sendo esses estudos relacionados a cultivo *in vitro* e à

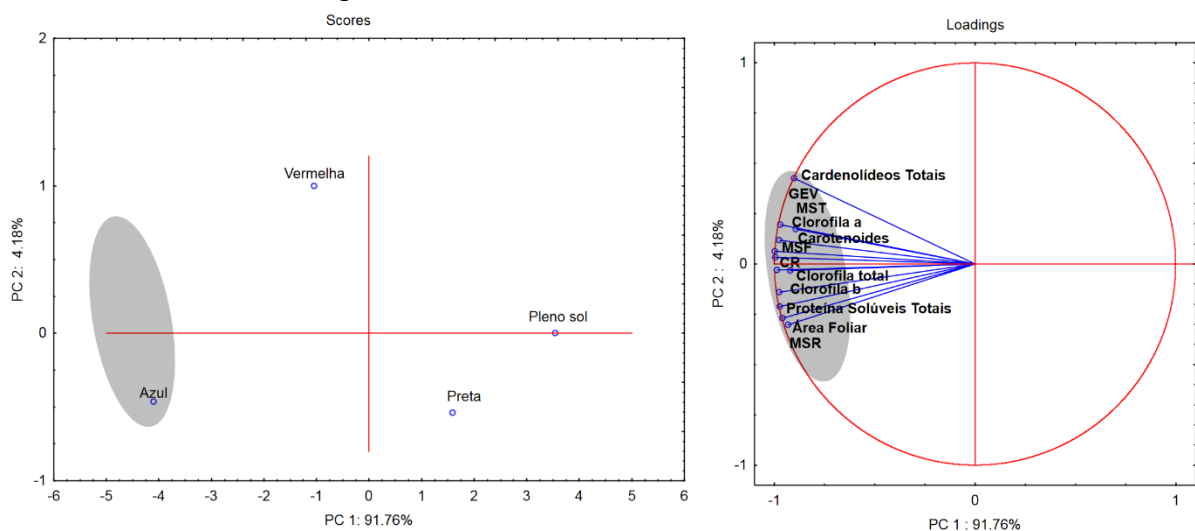
ausência de trabalhos associados ao cultivo em campo para *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* com foco na otimização da produção de GEV.

3.6 Análise dos Componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) tem como objetivo mostrar como os dados foram estruturados, correlação entre os dados, detectar os outliers e, assim, dando uma visão geral da interpretação das amostras, porque diminui o conjunto de dados. A PCA foi aplicada aos dados com o propósito de identificar as interações existentes entre as variáveis de resposta e as malhas coloridas utilizadas.

A PCA apresenta a correlação matricial entre crescimento vegetativo, pigmentos fotossintetizantes, proteína solúveis totais, cardenólídeos totais e glicoevatromonosídeo (GEV) com as malhas, explicando 95,94% da variação total (FIGURA 22). Assim, com o uso das PC1 (91,76%) e PC2 (4,18%), identificou-se a separação dos tratamentos em um grupo, em que foi observada uma diferença entre as plantas cultivadas a pleno sol, malha vermelha e malha preta das plantas sob malha azul (grupo 1).

Figura 22 - Análise de componentes principais (PCA) da correlação matricial entre crescimento vegetativo, pigmentos fotossintetizantes, proteína solúveis totais, cardenólídeos totais e glicoevatromonosídeo (GEV) com as malhas coloridas azul, vermelha, preta e tratamento a pleno sol.



Fonte: Da autora (2021).

A PCA destaca que os tratamentos que utilizam malha preta e cultivo a pleno sol não influenciaram os parâmetros avaliados. Além disso, a PCA também permitiu identificar as

correlações entre as treze variáveis avaliadas. Nota-se correlação positiva entre o acúmulo de matérias secas, a quantidade de clorofila (*a*, *b* e total), cardenólídeos totais, GEV e proteína com o uso de malha azul e, de forma negativa com a malha preta e pleno sol. A malha vermelha teve uma pequena correlação positiva com as variáveis estudadas.

Os resultados da PCA corroboram e complementam as análises e interpretações anteriores. O agrupamento de tratamento identifica, em contexto amplo, que o tratamento com malha azul é determinante para proporcionar ganhos significativos sobre as variáveis estudadas de crescimento e produção de GEV em *D. mariana*. A correlação positiva entre clorofilas totais e o acúmulo de matéria seca se justifica pelo fato de que os pigmentos fotossintéticos (principalmente clorofilas *a* e *b*) possuem ligação direta com a absorção e transferência de energia luminosa no processo fotossintético. Dessa forma, plantas com maiores teores de clorofila são capazes de produzir taxas fotossintéticas mais altas e conseqüentemente, influenciam no crescimento, desenvolvimento e no metabolismo da planta.

4 CONCLUSÃO

O planejamento experimental realizado permitiu otimizar e padronizar a extração de glicoevatromonosídeo em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, obtendo extratos representativos da constituição química da planta. O método cromatográfico desenvolvido e validado é inédito e corrobora com a confiabilidade dos resultados quantitativos de GEV neste presente estudo.

Diferentes espectros luminosos influenciam no crescimento e produção de pigmentos fotossintetizantes, proteínas, cardenolídeos totais e GEV em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. O cultivo sob malha fotoconversora azul proporciona maior ganho de biomassa seca e comprimento de raiz, matéria seca e área foliar, clorofila *a*, *b*, carotenoides e clorofila total, proteínas totais e maior acúmulo de cardenolídeos totais e quantidade de GEV.

Por fim, este trabalho corrobora para estabelecer a importância do espectro de luz azul e vermelha no crescimento e acúmulo de cardenolídeos em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, em especial, a luz azul que traz impactos positivos no acúmulo de GEV, um cardenolídeo de importância farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, B. *et al.* Phytochemical rich extract from the spent material generated from Industrial Dashamoola preparation (a medicinal Ayurvedic decoction) with antioxidant, antidiabetic and anti-inflammatory potential. **Industrial Crops and Products**, London, v. 151, Sept. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020303678>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- ALMEIDA, J. M.; CALABONI, C.; RODRIGUES, P. H. V. *Lisianthus* cultivation using differentiated light transmission nets. **Ornamental Horticulture**, Viçosa, MG, v. 22, n. 2, p. 143-146, 2016.
- ALVARENGA, I. C. A. *et al.* *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 122, p. 299-308, 2015.
- ALVES, A. C. *et al.* Biomass production and essential oil of lemon balm cultivated under colored screens and nitrogen. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 1, p. 94-99, 2018.
- AMARAL, T. A. **Crescimento, características estruturais e teor de óleo essencial de *Mentha suaveolens* Ehrh., cultivada sob telas coloridas**. 2007. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- ANAND, U. *et al.* A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**, Basel, v. 9, n. 11, p. 258, 2019.
- ANDERSON, J. M.; CHOW, W. S.; PARK, Y. I. The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. **Photosynthetic Research**, London, v. 46, p. 129-139, 1995.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 4, p. 463-472, 2009.
- ARTHURS, S. P.; STAMPS, R. H.; GIGLIA, F. F. Environmental modification inside photoselective shadehouses. **HortScience**, Alexandria, v. 48, n. 8, p. 975-979, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17th ed. Arlington: AOAC International, 2000.
- ATKINSON, R. R. L. *et al.* A non-targeted metabolomics approach to quantifying differences in root storage between fast- and slow-growing plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 196, n. 1, p. 200-211, 2012.
- BARNES, J. D. *et al.* A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 32, n. 2, p. 85-100, 1992.

BELL, F. K.; KRANTZ JUNIOR, J. C. *Digitalis*: IX., a spectroscopic study of baljet reaction for digitoxin and digitoxigenin. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, Baltimore, v. 39, n. 6, p. 319-322, 1950.

BERTOL, J. W. *et al.* Anti-herpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 92, p. 73-80, 2011.

BOSE, A. HPLC calibration process parameters in terms of system suitability test. **Chromatography**, Austin, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Madison, v. 72, p. 248, 1976.

BRAGA, F. C. *et al.* Complete ¹H and ¹³C assignments of the *Digitalis lanata* cardenolides, glucodigifucoside and glucogitoroside by 1D and 2D NMR. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, v. 35, n. 12, p. 899-903, 1997.

BRANT, R. S. *et al.* Adaptações fisiológicas e anatômicas de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) cultivadas sob malhas termorrefletoras em diferentes intensidades luminosas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 467-474, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 maio 2003. Disponível em: <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>. Acesso em: 31 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 141, 25 jul. 2017.

BRERETON, R. G. **Chemometrics**: data analysis for the laboratory and chemical plant. London: J. Wiley, 2002.

CACHO, M. *et al.* Effect of calcium restriction on cardenolide accumulation in two cell lines of *Digitalis thapsi* grown under different light regimes. **Acta Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 21, p. 335-340, 1999.

CENTOFANTE, A. R. Light quality on the morphoanatomy and physiology of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. seedlings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 259, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030442381930651X>. Acesso em: 10 mar. 2021.

CLEMENTE, E. S. *et al.* *Digitalis*. In: KOLE, C. (ed.). **Wild crop relatives**: genomic and breeding resources, plantation and ornamental crops. Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 73-112.

- COELHO, A. D. *et al.* Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 145, n. 1, p. 59-74, 2021.
- COELHO, R. A. *et al.* Nível de sombreamento, umidade do solo e morfologia do cafeeiro em sistemas agroflorestais. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 1, p. 95-102, 2010.
- CORREIA, R. M. *et al.* Crescimento de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de folhas de orégano sob malhas coloridas. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 5, n. 1, p. 11-22, 2012.
- COSTA, I. J. S. *et al.* Crescimento e fisiologia da geleia (*Butia capitata*) cultivada sob redes de sombra coloridas. **Acta Scientiarum, Agronomy**, Maringá, v. 40, p. 2-8, 2018.
- DONG, M.; PAUL, R.; GERSHANOV, L. Getting the peaks perfect: system suitability for HPLC. **Today's Chemist at Work**, Washington, DC, v. 10, n. 9, p. 38-40, 2001.
- DOUSSEAU, S. *et al.* Influência de diferentes condições de sombreamento sobre o crescimento de *Tapirira guianensis* Alb. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 477-479, 2017. Suplemento 2.
- DURAN, R. E.; KEYFLI, M. Effects of NaCl on phenolic compound production in callus culture of foxglove (*Digitalis purpurea* L.). **Fresenius Environmental Bulletin**, Freising, v. 30, n. 3, p. 2790-2798, 2021.
- ESKINS, K.; JIANG, C. Z.; SHIBLES, R. Light quality and irradiance effects on pigments, light harvesting proteins and Rubisco activity in a chlorophyll and light harvesting deficient soybean mutant. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, n. 83, p. 47-53, 1999.
- EVANS, J. R. Developmental constraints on photosynthesis: effects of light and nutrition. *In*: BAKER, N. R. (ed.). **Photosynthesis and the environment**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996. p. 281-304.
- FARAH, S. *et al.* *In vivo* studies: multi-disciplinary action of *Digitalis purpurea* L. extract in rabbits. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, New Delhi, v. 6, n. 2, p. 89-99, 2010.
- FARHADI, N. *et al.* Changes in essential oil compositions, total phenol, flavonoids and antioxidant capacity of *Achillea millefolium* at different growth stages. **Industrial Crops and Products**, London, v. 152, Sept. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669020304866>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.
- FIGUEIREDO, J. R. M. *et al.* Temperature, photoperiod and colored shade nets on the in vitro development of *Physalis peruviana* L. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 1205, p. 757-762, 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research.

Reviewer guidance: validation of chromatographic methods. Silver Springer: FDA, 2000.

FREITAS, J. C. D. O. *et al.* Características morfofisiológicas de plantas clonais de *Passiflora alata* crescidas em diferentes doses de nitrogênio e níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 859-872, 2012.

GANAPATY, S. *et al.* A review of phytochemical studies of *Digitalis* species. **Journal of Natural Remedies**, Bangalore, v. 3, n. 2, p. 104-128, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUREL, E. *et al.* Regeneration and cardiogenic glycoside production in *Digitalis davisiana* Heywood (Alanya foxglove). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, p. 217-225, 2011.

HAGIMORI, M.; MATSUMOTO, T.; OBI, Y. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture: II., effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. **Plant Physiology**, Washington, DC, v. 69, p. 653-656, 1982.

HE, B. *et al.* The effect of colored plastic films on the photosynthetic characteristics and content of active ingredients of *Dysosma versipellis*. **Horticulture Environment and Biotechnology**, Wanju-gun, v. 59, n. 4, p. 519-528, 2018.

HENRIQUE, P. C. *et al.* Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de mudas de café cultivadas sob telas de diferentes colorações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 5, p. 458-465, maio 2011.

HIPPLER, M. *et al.* Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Plant Journal**, Oxford, n. 28, p. 595-606, 2001.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.

HOGEWONING, S. W. *et al.* Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 11, p. 3107-3117, 2010.

HOLCMAN, E.; SENTELHAS, P. C. Crescimento e desenvolvimento de bromélias em ambiente protegido, cobertos com PEBD e diferentes malhas de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 3, p. 386-391, 2013.

HOSSAIN, M. A. *et al.* Effects of relative light intensity on the growth, yield and curcumin content of turmeric (*Curcuma longa* L.) in Okinawa, Japan. **Plant Production Science**, Shinkawa, v. 12, n. 1, p. 29-36, 2009.

HOSSEINI, A.; ZARE MEHRJERDI, M.; ALINIAEIFARD, S. Alteration of bioactive compounds in two varieties of Basil (*Ocimum basilicum*) grown under different light spectra. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, London, v. 21, n. 4, p. 913-923, 2018.

HUNG, C. D. *et al.* Led light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 38, n. 6, p. 152, 2016.

IKEDA, Y.; FUJII, Y. Quantitative determination of lanatosides in the hybrid *Digitalis ambigua* X *Digitalis lanata* leaves by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, New York, v. 26, n. 12, p. 2013-2021, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008**, de 05 de agosto de 2014. Brasília, DF: INMETRO, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008**, 2007. Brasília, DF: INMETRO, 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICAL FOR HUMAN USE. **ICH harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96)**. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 236, n. 1, p. 222-228, 2018.

KATEROVA, Z.; TODOROVA, D.; SERGIEV, I. Plant secondary metabolites and some plant growth regulators elicited by UV irradiation, light and/or shade. *In*: GHORBANPOUR, M.; VARMA, A. (ed.). **Medicinal plants and environmental challenges**. Berlin: Springer International, 2017. p. 97-121.

KHAN, S. A. *et al.* Chlorophylls as pigment: a contemporary approach. *In*: YUSUF, M. (ed.). **Handbook of renewable materials for coloration and finishing**. New York: Wiley, 2018. p. 115-123.

KIRMIZIBEKMEZ, H. *et al.* Phenylethyl glycosides from *Digitalis lanata*. **Helvetica Chimica Acta**, Berlin, v. 92, n. 9, p. 1845-1852, 2009.

KREIS, W. The Foxgloves (*Digitalis*) revisited. **Planta Medica**, Stuttgart, n. 23, p. 180-185, 2017.

KREIS, W.; HAUG, B.; YÜCESAN, B. Somaclonal variation of cardenolide content in Heywood's foxglove, a source for the antiviral cardenolide glucoevatromonoside, regenerated from permanent shoot culture and callus. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**, Wallingford, v. 51, p. 35-41, 2015.

KURODA, M. *et al.* New cardenolide glycosides from the seeds of *Digitalis purpurea* and their cytotoxic activity. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 77, n. 6, p. 1186-1192, 2013.

LEONG, T. Y.; ANDERSON, J. M. Effect of light quality on the composition and function of thylakoid membranes in *Atriplex triangularis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 766, p. 533-541, 1984.

LIMA, M. C. *et al.* Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos em *Achillea millefolium* cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio em milfolhas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 45-50, 2011.

LIMA, M. C. *et al.* Effect of shading and nitrogen fertilization on nitrogen metabolism, essential oil content and antimicrobial activity of *Achillea millefolium*. **Acta Scientiarum: biological sciences**, Maringá, v. 42, p. 1-12, 2020.

LIMA, V. A. *et al.* Growth, photosynthetic pigments and production of essential oil of long-pepper under different light conditions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 1167-1174, 2017.

LIN, K. H. *et al.* The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 150, p. 86-91, 2013.

LIU, J. *et al.* Systematic identification metabolites of *Hemerocallis citrina* Borani by high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with a screening method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 186, July 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32361472/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

LÓPEZ-LÁZARO, M. *et al.* Anti-tumour activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. *heywoodii*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 8, p. 701-704, 2003.

LUCKNER, M.; WICHTL, M. **Digitalis**: geschichte, biologie, chemie, physiologie, molekularbiologie, pharmakologie, medizinische anwendung. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2000.

MARTINS, J. R. *et al.* Anatomia foliar de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/5qkynSqchvXFMcwR8pRhF7C/?lang=pt>. Acesso em: 10 mar. 2021.

MARTINS, J. R. *et al.* Avaliação do crescimento e do teor de óleo essencial em plantas de *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 102-107, 2008.

MEIRA, M. R.; MARTINS, E. R.; MANGANOTTI, S. A. Crescimento, produção de fitomassa e teor de óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 352-357, 2012.

MELO, A. A. M.; ALVARENGA, A. A. de. Sombreamento de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don “Pacifica White” por malhas coloridas: Desenvolvimento vegetativo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 514-520, mar./abr. 2009.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 2nd ed. New York: Wiley, 1996.

MOORE, W. N.; TAYLOR, L. T. Extraction and quantitation of digoxin and acetyldigoxin from the *Digitalis lanata* leaf via near-supercritical methanol-modified carbon dioxide. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, n. 7, p. 690-693, 1996.

MUNEER, S. *et al.* Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **Internacional Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 3, p. 4657-4670, Mar. 2014.

MURCHIE, E. H.; HORTON, P. Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 20, p. 438-448, 1997.

NARTOP, P.; ALTAN, A. D.; TITREK, A. Modeling of in vitro biomass production of digitalis purpurea under the effects of biosynthetic silver nanoparticles. **Iranian Journal of Science and Technology**, New York, v. 45, n. 3, p. 775-783, 2021.

NASCIMENTO, M. E. *et al.* Plasticidade foliar e produção de biomassa seca em *Copaifera langsdorffii* Desf. Cultivada sob diferentes espectros de luz. **Revista de Ciências Agrárias: Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Belém, v. 57, n. 1, p. 41-48, 2014.

NAVARRO, E. *et al.* Cardiovascular activity of a methanolic extract of *Digitalis purpurea* ssp. *heywoodii*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 71, n. 3, p. 437-442, 2000.

NOORHOSSEINI, S. A.; FALLAHI, E.; DAMALAS, C. A. Promoting cultivation of medicinal and aromatic plants for natural resource management and livelihood enhancement in Iran. **Environment, Development and Sustainability**, London, v. 22, n. 5, p. 4007-4024, 2020.

OH, J. W. *et al.* Effects of phenylethanoid glycosides from *Digitalis purpurea* L. on the expression of inducible nitric oxide synthase. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 57, n. 7, p. 903-910, 2005.

OHLSSON, A. B.; BJÖRK, L.; GATENBECK, S. Effect of light on cardenolide production by *Digitalis lanata* tissue cultures. **Phytochemistry**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 2447-2450, 1983.

OLIVEIRA, G. C. *et al.* Photosynthetic behavior, growth and essential oil production of *Melissa officinalis* L. cultivated under colored shade nets. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago de Chile, v. 76, n. 1, p. 123-128, 2016.

- OLIVEIRA, M. I. *et al.* Características biométricas, anatômicas e fisiológicas de *Artemisia vulgaris* L. cultivada sob telas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 56-62, 2009.
- OREN-SHAMIR, O. M. *et al.* Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p. 353-361, 2001.
- PARK, Y.; RUNKLE, E. S. Far-red radiation promotes growth of plantlets by increasing leaf expansion and whole-plant net assimilation. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 136, n. 1, p. 41-49, 2017.
- PEREIRA-FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química**: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos: Ed. UFSCar, 2015.
- PÉREZ-ALONSO, N. P. *et al.* Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 151-156, 2009.
- PÉREZ-ALONSO, N. P. *et al.* Efficient direct shoot organogenesis, genetic stability and secondary metabolite production of micropropagated *Digitalis purpurea* L. **Industrial Crops and Products**, London, v. 116, p. 259-266, 2018.
- PÉREZ-BERMÚDEZ, P. *et al.* *Digitalis purpurea* P5 β R2, encoding steroid 5 β -reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis. **New Phytologist**, Cambridge, v. 185, n. 3, p. 687-700, 2010.
- PINTO, J. E. B. P. *et al.* Produção de biomassa e óleo essencial em mil folhas cultivada sob telas coloridas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, p. 321-326, 2014.
- QUEIROZ, C. R. A. *et al.* Crescimento inicial e composição química de *Pereskia aculeata* Miller cultivada em diferentes luminosidades. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 7, n. 4, p. 93-104, dez. 2015.
- RAD, M. M. *et al.* Phytochemical changes of *Digitalis purpurea* L. in response to polyamines and methyl jasmonate application in callus culture. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 2021, p. 1-10, July 2021.
- ROLIM, J. C. *et al.* Hiperplasia miointimal na artéria ilíaca em coelhos submetidos à angioplastia e tratados com *Moringa oleifera*. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 28-34, 2016.
- ROSAL, L. F. *et al.* Características fisiológicas de plantas de boldo pequeno cultivadas sob malhas fotoconversoras. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 2, 2008. 1 CD-ROM.
- SABBI, L. B. C.; ÂNGELO, A. C.; BOEGER, M. R. Influência da luminosidade nos aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) implantadas em duas áreas com diferentes graus de sucessão nas margens do Reservatório Iraí, Paraná, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 65, n. 2, p. 171-181, 2010.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 41, p. 177-185, 1995.

SALEEM, H. *et al.* *Filago germanica* (L.) Huds. bioactive constituents: secondary metabolites fingerprinting and *in vitro* biological assays. **Industrial Crops and Products**, London, v. 152, Sept. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020304210#!>. Acesso em: 10 mar. 2021.

SALOMÓN, R. *et al.* The growth promoting and immunomodulatory effects of a medicinal plant leaf extract obtained from *Salvia officinalis* and *Lippia citriodora* in gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 524, July 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848620303100>. Acesso em: 10 mar. 2021.

SANTOS, R. P. *et al.* Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Ceres**, Viçosa, MG, v. 55, n. 4, p. 356-364, 2008.

SCHEIBNER, H. *et al.* Influence of Light on Cardenolide Accumulation in Somatic Embryos of *Digitalis lanata*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 130, n. 2/3, p. 211-219, 1987.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E. E. Colornets: crop protection and light-quality manipulation in one technology. **Production, Pest Management and Global Competition**, Kissimmee, v. 659, p. 143-151, 2004.

SILVA, G. M. da. **Adubação orgânica, micropropagação e validação analítica para doseamento de cardenolídeos totais em *Digitalis purpurea* subs. *heywoodii***. 2017. 105 p. Tese (Doutorado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

SILVA, S. T. *et al.* Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017.

SNYDER, C. R. *et al.* The development and validation of the Children's Hope Scale. **Journal of Pediatric Psychology**, Washington, DC, v. 22, n. 3, p. 399-421, June 1997.

SOAVE, R. C. F.; SILVA, O. A. Aspectos fenológicos e variação dos conteúdos das clorofilas a e b em *Caryocar brasiliense* CAMB. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 36, n. 1, p. 57-69, 1993.

SOUZA, G. S. de *et al.* Características biométricas e fisiológicas de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 330-335, 2010.

SOUZA, G. S. de *et al.* Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos em alfavaca cultivada sob malhas coloridas e adubação fosfatada. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 296-306, 2011a.

SOUZA, G. S. de *et al.* Crescimento, produção de biomassa e aspectos fisiológicos de plantas de *Mentha piperita* L. cultivadas sob diferentes doses de fósforo e malhas coloridas. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 6, n. 3, p. 35-44, 2013.

SOUZA, G. S. de *et al.* Crescimento, produção de biomassa e aspectos fisiológicos de plantas de *Mentha piperita* L. cultivadas sob diferentes doses de fósforo e malhas coloridas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 36-42, 2012.

SOUZA, G. S. de *et al.* Crescimento, teor de óleo essencial conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 24, n. 3, p. 1-11, set. 2011b.

SOUZA, G. S. de *et al.* Photosynthetic pigments content, photosynthesis rate and chloroplast structure in young plants of *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex baker grown under colored nets. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 32, p. 1843-1854, 2011. Supplement 1.

SOUZA, G. S. de *et al.* Vegetative growth and yield of essential oil of the rosemary plants development when cultivated under colored screens. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 232-239, 2014. Suplemento 1.

STITT, M.; SCHULZE, D. Does RuBisCO control the rate of photosynthesis and plant growth?: an exercise in molecular Ecophysiology. **Plant Cell and Environment**, Oxford, n. 17, p. 465-487, 1994.

STUHLEMMER, U. *et al.* Cardiac glycosides in partly submerged shoots of *Digitalis lanata*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 59, n. 6, p. 539-545, 1993.

SUN, J.; NISHIO, J. N.; VOGELMANN, T. C. Green light drives CO₂ fixation deep within leaves. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 1020-1026, 1998.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

TLILI, N.; SARIKURKCU, C. Bioactive compounds profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of water extracts from five selected medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, London, v. 151, Sept. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020303642>. Acesso em: 10 mar. 2021.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **USP29-NF24**. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006.

VERMA, S. K. *et al.* Enhanced growth and cardenolides production in *Digitalis purpurea* under the influence of different LED exposures in the plant factory. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-36113-9>. Acesso em: 10 mar. 2021.

VERMA, S. K. *et al.* In vitro culture of *Digitalis* L. (Foxglove) and the production of cardenolides: an up-to-date review. **Industrial Crops and Products**, London, v. 94, p. 20-21, 2016.

VIEIRA, E. L. *et al.* **Manual de fisiologia vegetal**. São Luís: EDUFMA, 2010. 186 p.

VIEIRA, J. S. **Propagação vegetativa, crescimento e teor de proteína em ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) cultivado sob telas foto seletivas**. 2017. 52 f. Dissertação (Mestrado em Olericultura) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Morrinhos, 2017.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

WHITELAM, G.; HALLIDAY, K. **Light and plant development**. Oxford: Blackwell, 2007.

XIE, G. *et al.* Dynamic analysis of secondary metabolites in various parts of *Scrophularia ningpoensis* by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 186, July 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32375107/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

XIE, W. *et al.* Effect of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & pharmacology**, New York, v. 143, n. 4, p. 429-435, Aug. 2006.

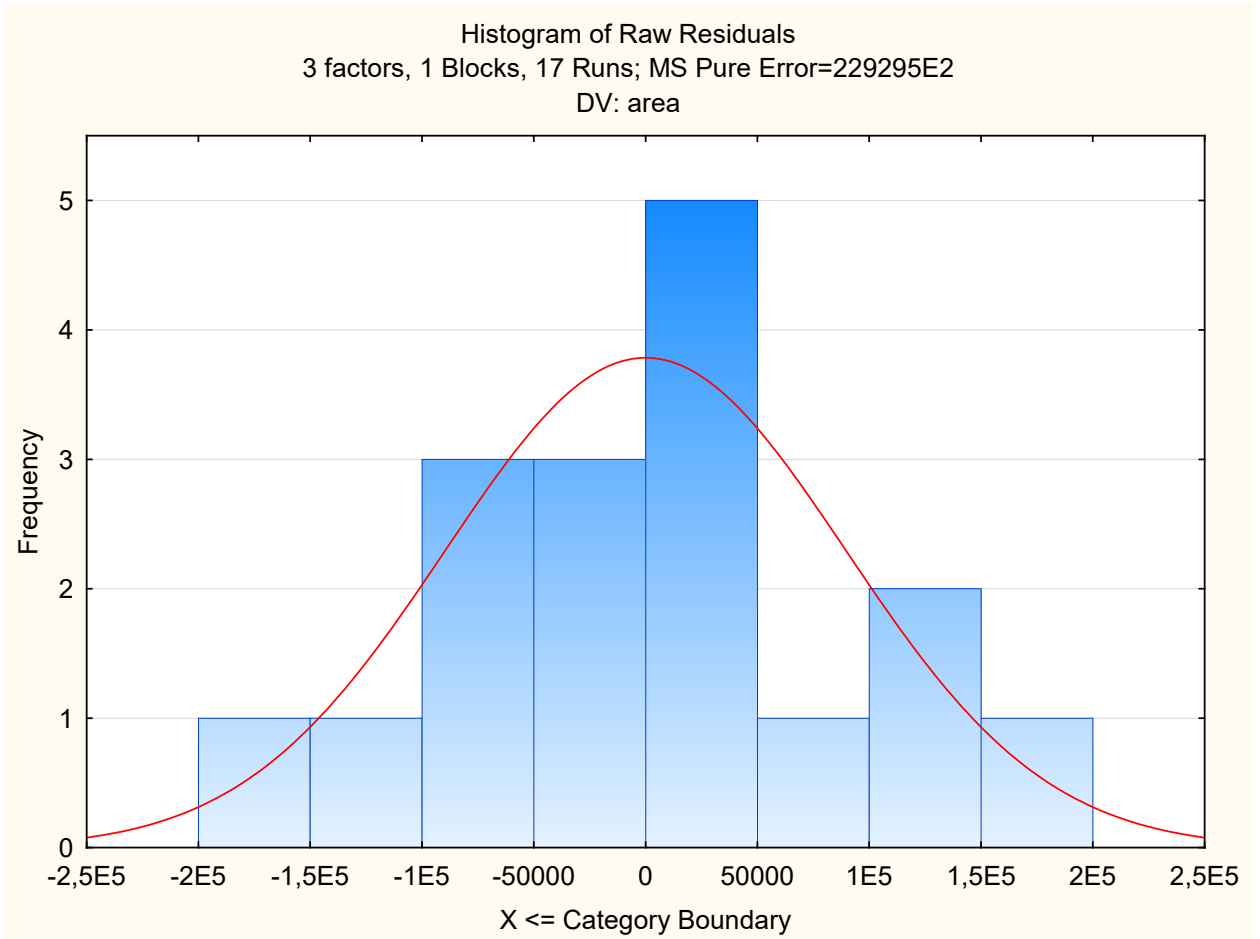
YANG, F. *et al.* Auxin-to-Gibberellin ratio as a signal for light intensity and quality in regulating soybean growth and matter partitioning. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, n. 56, p. 1-13, 2018.

YANG, Q. *et al.* Yellow light promotes the growth and accumulation of bioactive flavonoids in *Epimedium pseudowushanense*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Lausanne, v. 197, Aug. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31330424/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

YIN, Z. H.; JOHNSON, G. N. Photosynthetic acclimation of higher plants to growth in fluctuating light environments. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 63, n. 1, p. 97-107, 2000.

YOSHIMATSU, K. *et al.* Determination of cardenolides in hairy root cultures of *Digitalis lanata* by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 53, n. 6, p. 1498-1502, 1990.

YÜCESAN, B. *et al.* Cardenolide estimation in callus-mediated regenerants of *Digitalis lamarckii* Ivanina (dwarf foxglove). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, n. 50, p. 137-142, 2014.

ANEXO A - DISTRIBUIÇÃO NORMAL DO RESÍDUO

ARTIGO 2 - CULTIVO DE *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* SOB OMISSÃO DE NUTRIENTES EM SISTEMA HIDROPÔNICO

ARTICLE 2 - CULTIVATION OF *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* UNDER THE OMISSION OF NUTRIENTS IN A HYDROPONIC SYSTEM

Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.

RESUMO

D. mariana ssp. *heywoodii* possui em suas folhas cardenolídeos como o glicoevatromonosídeo (GEV). O GEV é um metabólito secundário de interesse medicinal, o qual tem sua produção influenciada pela interação planta-ambiente, sendo imprescindível o manejo adequado da fertilidade para melhor crescimento e produtividade. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da omissão de nutrientes no crescimento, acúmulo de proteínas e produção de cardenolídeos em plantas de *D. mariana* ssp. *heywoodii* cultivadas em sistema hidropônico. O crescimento da espécie foi afetado pela omissão de nutrientes, alterando o crescimento, sobrevivência e morfologia das plantas. A omissão de nitrogênio (N), fósforo (P), enxofre (S) e manganês (Mn) não afetou o crescimento da parte aérea das plantas. A deficiência de nitrogênio (N) e magnésio (Mg) foram os que mais prejudicaram o crescimento das raízes. Os menores valores de clorofila total foram encontrados em plantas sob omissão de nitrogênio (N), magnésio (Mg) e zinco (Zn). A deficiência de boro (B) e magnésio (Mg) causaram um maior acúmulo de proteínas totais (0,066 e 0,062 mg mL⁻¹, respectivamente). Entretanto, a deficiência de enxofre (S) causou uma queda de 51,9% em relação ao tratamento completo. A limitação de nutrientes impactou o acúmulo de cardenolídeos totais na seguinte ordem Cu = Fe = Mg = Ca > Mn = B = Zn > S = K = P = N = completo. Contudo, a omissão de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e enxofre (S) não impactaram o teor de cardenolídeos totais. Quanto ao acúmulo de GEV, a limitação de potássio (K) levou a um aumento de 1,89 vezes o teor de GEV em relação ao tratamento completo. Entretanto, a omissão de manganês (Mn) inibiu a produção deste cardenolídeo. Desta forma, conclui-se que o crescimento vegetativo, teor de proteínas, acúmulo de cardenolídeos e GEV são afetados pela disponibilidade de macro e micronutrientes.

Palavras-chave: Dedaleira. Cultivo. Glicoevatromonosídeo. Nutrição de plantas. Cardenolídeos.

ABSTRACT

D. mariana ssp. *heywoodii* has cardenolides such as glucoevatromonoside (GEV) in its leaves. GEV is a secondary metabolite of medicinal interest, which has its production influenced by the plant-environment interaction. The proper fertility management is essential to achieve better growth and productivity. In this context, this paper aimed to evaluate the influence of nutrient omission on the growth, protein accumulation, and cardenolide production in *D. mariana* ssp. *heywoodii* plants cultivated in a hydroponic system. The growth of the species was affected by the omission of nutrients, altering the plants' growth, survival, and morphology. The omission of nitrogen (N), phosphorus (P), sulfur (S), and manganese (Mn) did not affect the growth of the aerial part of the plants. Nitrogen (N) and magnesium (Mg) deficiency were the most limiting factors for root growth. The lowest total chlorophyll values were found in plants under the omission of nitrogen (N), magnesium (Mg), and zinc (Zn). Boron (B) and magnesium (Mg) deficiency caused greater accumulation of total protein (0.066 and 0.062 mg mL⁻¹, respectively). However, sulfur (S) deficiency caused a decrease of 51.9% compared to the full treatment. The nutrient limitation impacted the accumulation of total cardenolides in the following order: Cu = Fe = Mg = Ca > Mn = B = Zn > S = K = P = N = full. However, the omission of nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), and sulfur (S) did not affect the total cardenolide content. The potassium (K) limitation led to a 1.89-fold increase in the GEV content compared to the full treatment. However, the omission of manganese (Mn) inhibited the production of this cardenolide. Thus, it is concluded that the availability of macro and micronutrients affect vegetative growth, protein content, accumulation of cardenolides, and GEV.

Keywords: Foxglove. Cultivation. Glucoevatromonoside. Plant nutrition. Cardenolides.

1 INTRODUÇÃO

Digitalis mariana ssp. *heywoodii* é uma espécie endêmica e ameaçada de extinção que cresce apenas em alguns locais da Península Ibérica, possuindo em sua composição química cardenolídeos responsáveis por grande parte das suas atividades farmacológicas e aplicações terapêuticas, despertando assim grande interesse no âmbito da pesquisa e da indústria farmacêutica (CLEMENTE *et al.*, 2011; KRISHNA *et al.*, 2015; PATIL *et al.*, 2013).

Essa espécie apresenta em suas folhas cerca de 0,15% de GEV, sendo considerada uma importante fonte deste cardenolídeo (BERTOL *et al.*, 2011; KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015; LUCKNER; WICHTL, 2000; NAVARRO *et al.*, 2000). O GEV apresenta potenciais efeitos antivirais e anticâncer, não sendo disponível comercialmente devido a dificuldade de desenvolvimento da espécie em seu cultivo, sendo utilizado para sua extração de plantas cultivadas *in vitro* (KREIS; HAUG; YÜCESAN, 2015).

A produção de metabólitos secundários em plantas medicinais, como o GEV, está relacionada diretamente com a genética e a interação da planta com o seu ambiente, como influência da radiação solar, limitação hídrica e fertilidade do solo (VERMA *et al.*, 2016). Desta forma, o manejo adequado da fertilidade do solo, além de possibilitar o crescimento e desenvolvimento e maior produtividade, é imperativo na produção de plantas para uso na indústria para obtenção de compostos como os cardenolídeos.

Entretanto, estudos sobre nutrição mineral de plantas medicinais são escassos, principalmente aqueles relacionados à produção e acúmulo de metabólitos secundários (CENTOFANTE, 2020). Neste contexto, objetivou-se avaliar o crescimento vegetativo e os teores de cardenolídeos totais (CT) e GEV em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, empregando a técnica do elemento faltante com omissão dos macronutrientes N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, B, Mn e Cu em solução nutritiva.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do experimento e obtenção das mudas

Sementes de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* (Jelitto Seeds ®, Alemanha) foram germinadas em bandejas de poliestireno expandido com 128 células, em casa de vegetação no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras/MG. O local está localizado a 918 m de altitude, com temperatura média de 26 ± 2 °C e umidade relativa de 75%.

Plântulas com 120 dias de idade foram padronizadas e transferidas para uma bandeja plástica contendo 20 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) adaptada com sistema permanente de aeração. Foram utilizadas placas de isopor de 4 cm de espessura como suporte para as plantas. As soluções foram trocadas semanalmente, monitoradas diariamente e completadas com água deionizada, para manter o nível da solução constante.

Inicialmente, para adaptação das plântulas, a concentração da solução utilizada foi de 25% na primeira semana e de 50% na semana posterior. Na terceira semana o experimento foi instalado. As soluções foram preparadas com os sais puros e a composição química da solução nutritiva completa foi de 210,1 mg de N; 31 mg de P; 234,6 mg de K; 200,4 mg de Ca; 48,6 mg de Mg; 64,2 mg de S; 500 µg de B; 20 µg de Cu; 5,022 µg de Fe; 502 µg de Mn e 50 µg de Zn por litro de solução.

As mudas foram cultivadas em vasos com capacidade de 6 L de solução, que tiveram suas superfícies externas pintadas com tinta alumínio. Uma tampa de isopor com pequeno orifício no centro foi instalada para a fixação da planta. Os tratamentos foram constituídos do uso da solução completa e as omissões individual das fontes de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, B, Mn e Cu da solução de Hoagland e Arnon (1950) adaptada, resultando em 12 tratamentos. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 3 repetições e cada parcela constituída de uma planta por vaso.

As soluções foram trocadas quinzenalmente com sistema permanente de aeração e completadas diariamente com água deionizada para manter o nível constante da solução. Foram utilizadas placas de isopor de 4 cm de espessura como suporte para as plantas. O experimento foi monitorado todos os dias, ao após 60 dias, quando as plantas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* foram colhidas por estarem entrando em processo de senescência.

Cada tratamento foi avaliado em relação a parâmetros de crescimento vegetal e em seguida separadas em parte aérea de folhas e raízes e todo o material foi seco em estufa com

circulação forçada de ar a $70 \pm 2^\circ\text{C}$ utilizando-se balança analítica de precisão (BL 3200H - Shimadzu®), e avaliadas em relação a quantificação de pigmentos fotossintetizantes, análise quantitativa de cardenolídeos, GEV e proteínas solúveis, buscando identificar tratamento é capaz de melhorar os parâmetros avaliados.

2.2 Determinação do crescimento vegetal

Ao final dos 60 dias após o transplante das mudas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, avaliou-se as seguintes variáveis: comprimento e largura das folhas (cm), área foliar (cm^2) (mensurada por meio do software WinFOLIATM e scanner EPSON PERFECTION V700 PHOTO), comprimento do sistema radicular (cm), número de folhas por vaso; matéria seca de folha (g planta^{-1}) e raízes (g planta^{-1}). O material coletado foi armazenado em sacos de papel pardo, identificados individualmente e seco em estufa de circulação de ar forçado (320 SE - FANEN®), reguladas com a temperatura de 70°C , por 24 h, até apresentarem peso constante. Após a secagem, o material foi pesado em balança analítica para determinação da matéria seca.

2.3 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes

Após 60 dias de condução do experimento, foram coletadas 3 pares de folhas completamente expandidas do terceiro nó superior de 3 plantas de cada tratamento, tomadas ao acaso. As folhas foram coletadas no período entre 7:00 e 7:30 horas da manhã, embrulhadas em papel alumínio e acondicionadas em uma caixa de isopor contendo gelo até a transferência ao Laboratório de Plantas Mediciniais e Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA.

Os procedimentos adotados para a extração e análise das clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides foram realizados conforme a metodologia de Hiscox e Israelstam (1979) com adaptações propostas por Banes *et al.* (1992). Utilizou-se 50 mg de folhas frescas, rasuradas e sem a nervura central. As folhas foram pesadas em balança de precisão, em sala escura com iluminação verde. Após a pesagem, as folhas foram acondicionadas em tubos falcon envoltos em folha de alumínio contendo 10 mL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3). Em seguida, os tubos foram acondicionados em estufa sob temperatura de 65°C , por 24 h. A saturação do DMSO seguiu o protocolo de Santos *et al.* (2008) com modificações. Para isto, o DMSO foi saturado com CaCO_3 na proporção de 5g L^{-1} de DMSO, sob agitação constante por 4 h e então filtrado 2 vezes à vácuo em papel de filtro duplo. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos.

Após esse período, realizaram-se as leituras das absorbâncias utilizando 3 mL das alíquotas das soluções em cubeta de quartzo, em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO operado com o sistema de processamento de dados I-control® (versão 3.37). Utilizaram-se os comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm para clorofila *a*, *b* e carotenoides, respectivamente. A leitura do branco foi realizada com DMSO saturado com CaCO₃. Todas as leituras foram realizadas no escuro e em triplicata, sendo os teores expressos em mg g⁻¹ de matéria fresca (MF) de acordo com a metodologia de Wellburn (1994), sendo:

$$\text{Clorofila } a \text{ } 649 = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$\text{Clorofila } b \text{ } 665 = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

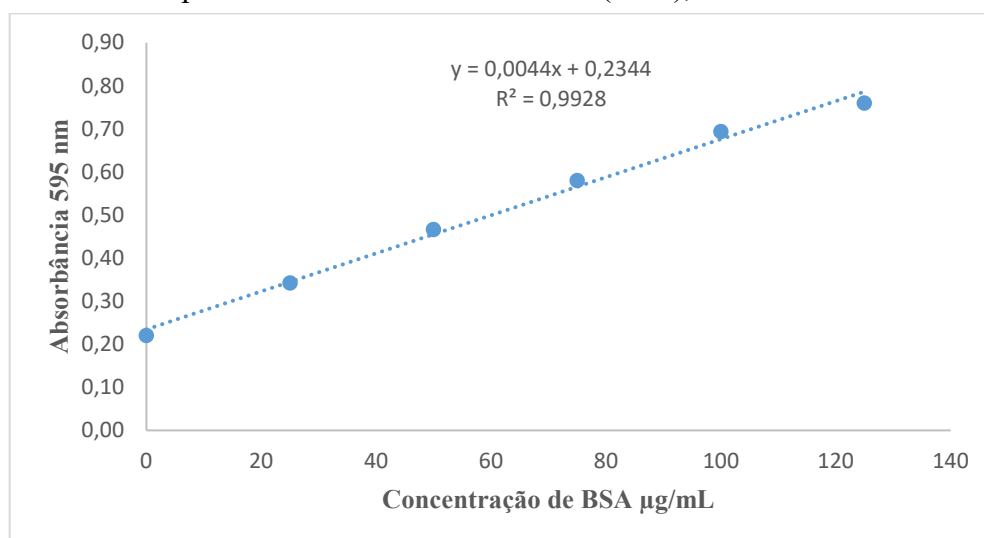
$$\text{Carotenoide } 480 = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b)/220;$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

2.4 Determinação de proteínas totais

Foram amostradas 15 mg de folhas de cada tratamento, sendo o teor determinado conforme metodologia descrita por Bradford (1976). As leituras foram efetuadas no espectrofotômetro TECAN Infinity® M200 PRO a 595 nm e comparadas com a curva-padrão de soro albumina bovina (BSA) 1 g L⁻¹, ajustada por regressão linear ($y = 0,0044x + 0,2344$, $R^2 = 0,9928$) (FIGURA 1) para determinação da concentração de proteína foliar, expressa em mg mL⁻¹ extrato proteico. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 1 - Curva-padrão de soro albumina bovina (BSA), com coeficiente linear (R^2).



Fonte: Da autora (2021).

2.5 Análises quantitativas de cardenólídeos

2.5.1 Doseamento de cardenólídeos totais

O doseamento de cardenólídeos totais seguiu o método validado por Silva (2017) no Laboratório de Fitoquímica da UFLA. Para detalhamento da metodologia vide item 2.4 do Artigo 1 deste documento.

Os dados foram expressos em teores percentuais de cardenólídeos totais, expressos em β -metildigitoxina.

2.5.2 Quantificação de glicoevatromonosídeo (GEV)

A metodologia extrativa utilizada neste trabalho foi validada anteriormente (item 2.6.3.1). A massa de 125 mg de folhas secas pulverizadas foram extraídas com a mistura trinária de 0,333 μ L de metanol, 0,333 μ L de etanol e 0,333 μ L de água. A extração foi realizada por 1 ciclo de 31 minutos de maceração assistida por ultrassom em temperatura ambiente. O extrato foi, microcentrifugado a 13000 g por 10 min. Após, foram adicionados ao sobrenadante 300 μ L de acetato de chumbo a 15% (p/v) e homogeneizado por vortex por 3 segundos, onde este foi mantido por 5 min em temperatura ambiente (25 °C). Após este período, as amostras foram novamente microcentrifugadas. Uma vez removido o precipitado, 200 μ L de solução aquosa de fosfato monossódico (Na_2HPO_2) a 10% (p/v) foram adicionados ao sobrenadante, homogeneizado por vortex e, em seguida, este foi microcentrifugado. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 5 mL e a ele foi adicionado 1 mL de clorofórmio:isopropanol (3:2 v/v) e centrifugado a 13000 g durante 5 min. A fase inferior foi transferida para um balão e, então rotaevaporada até *secura*.

Os extratos foram transferidos diretamente para microtubos de 5 mL e solubilizados em 1.000 μ L de metanol (MeOH) grau CLAE, seguido de sonicação até dissolução completa (1 a 2 min), seguido de centrifugação a 8.400 g, por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para vials e analisados por CLAE.

A condição cromatográfica estabelecida, conforme Tabela 1, para a quantificação de glicoevatromonosídeo (GEV) em extrato de folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* inclui o uso de coluna Eclipse XDB-C18 (150 mm \times 4,6 mm d.i. 5 μ m), temperatura da coluna de 40 °C, fase móvel constituída por água ultrapura e acetonitrila grau CLAE, ambas contendo 0,1%

de ácido fosfórico, fluxo: 1,5 mL min⁻¹, comprimento de onda de detecção: 230 nm e volume de injeção de 10 µL.

Tabela 1 - Condição cromatográfica estabelecida para a quantificação de GEV em extrato de folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
35	58	42
45	40	60
48	5	95
53	5	95
58	95	5
65	95	5

Fonte: Da autora (2020).

O cálculo para obtenção dos teores de GEV expressos em µg/100 g de material vegetal, foram obtidas utilizando-se a equação da curva média obtida pela linearidade $y=737784x-18718$.

2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Utilizou-se o software SISVAR® (FERREIRA, 2019) para processamento dos dados obtidos.

E o software Statistica®, versão 13.3 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA) foi utilizado para análise de componentes principais (PCA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do crescimento vegetal

O crescimento de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* foi afetado no cultivo em solução nutritiva com omissão de nutrientes (TABELA 2).

Tabela 2 - Comprimento de raiz (CR), matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST) e relação parte/aérea/raiz (PA/R) de plantas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. Lavras, MG, 2022.

Tratamento	CR (cm)	MSR (g)	MSPA (g)	MST (g)	PA/R
Completo	25,7±4,2a	7,1±1,4 a	29,2±4,4 a	36,3±8,1 a	4,11±1,4 c
- N	10,0±3,3e	1,0±0,2 b	19,0±5,3 a	20,0±7,3 a	19,0±4,3 a
- P	21,7±3,5b	1,6±0,9 b	17,6±2,5 a	19,2±4,1 a	11,0±2,7 b
- K	15,3±2,4d	1,2± 0,3b	7,5±2,5 b	8,7±3,4 b	6,3±2,4 c
- Ca	18,0±4,1c	0,5±0,3 b	4,2±2,1 b	4,7±0,9 b	8,4±2,1 c
- Mg	8,0±5,4e	1,5±0,5 b	3,2±2,2 b	4,7±1,5 b	2,1±0,9 c
- S	21,3±4,9 b	7,8±2,4 a	25,9±6,5 a	33,7±6,5 a	3,3±2,0 c
- Fe	16,0±3,6 d	0,8±0,3 b	5,5±2,2 b	6,3±2,2 b	6,9±2,4 c
- Zn	18,0±4,6 c	1,3±0,4 b	5,4±2,9 b	6,7±1,9 b	4,2±1,5 c
- B	14,3±3,2 d	1,6±0,9 b	9,2±2,2 b	10,8±5,4 b	5,8±2,6 c
- Mn	17,5±3,5 c	2,6±0,8 b	21,8±5,4 a	24,4±5,7 a	8,4±2,1 c
-Cu	19,0±4,5 c	1,8±0,5 b	8,1±2,4 b	9,9±2,1 b	4,5±1,1 c
CV (%)	35,86	26,94	37,66	29,53	28,91

Fonte: Da autora (2021).

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

A solução nutritiva completa obteve o maior comprimento de raiz (25,7 cm) e a omissão de Mg o menor comprimento (8,0 cm). A omissão de macro e micro nutrientes reduziu o comprimento médio das raízes, sendo observada a limitação em ordem decrescente: Mg=N > B = K = Fe > Mn = Ca = Zn = Cu > S = P > completo. A deficiência de nitrogênio (N) e magnésio (Mg) foram as que mais causaram impacto no crescimento das raízes em *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. A omissão de enxofre (S) não influenciou o peso seco das raízes da espécie, não diferindo estatisticamente do tratamento sem omissão de nutrientes (completo), sendo observado os valores 7,8 e 7,1, para MSR do tratamento com omissão de enxofre e sem omissão de nutrientes, respectivamente. É possível analisar que a deficiência dos nutrientes impactou o acúmulo de matéria seca das plantas, sendo observada a limitação em ordem decrescente de Mg = Ca = Zn = Fe = K = Cu = B > P = N = Mn = S = Completo para a matéria

seca da parte aérea (MSPA) e a limitação de Mg = Ca = Fe = Zn = K = Cu = B > P = N = Mn = S = completo para a matéria seca total (MST).

A omissão de nitrogênio (N), fosforo (P), enxofre (S) e manganês (Mn) não afetou o crescimento da parte aérea das plantas de *D. mariana ssp. heywoodii*, resultando em valores de MSPA e MST estatisticamente iguais aos do tratamento completo. Entretanto, a omissão de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), boro (B) e cobre (Cu) foram limitantes quanto a MSPA e MST (TABELA 2).

Apesar de cultivadas com todos os macro e micronutrientes, as plantas do tratamento completo apresentaram morte de algumas folhas mais velhas. A quantidade utilizada dos nutrientes no tratamento completo pode ter sido inadequada para o desenvolvimento das plantas, uma vez que a quantidade requerida depende da necessidade de cada espécie (ALVARENGA, 2013; TAIZ *et al.*, 2017). De acordo com Vale *et al.* (2011) as mudas utilizadas nos experimentos podem assimilar e reservar os macro e micronutrientes antes do transplântio em seus caules, folhas e raízes, sendo já suficientes para o crescimento inicial da espécie. Observa-se que a omissão de nutrientes reduziu a sobrevivência de *Digitalis mariana ssp. heywoodii*. As plantas cultivadas com omissão de Ca, Fe Mn tiveram sua sobrevivência de somente 29%.

Plantas com deficiência de nitrogênio (N) desenvolveram bem a parte aérea, entretanto o crescimento da raiz foi comprometido, resultando em altos valores da relação parte aérea/raiz (PA/R) (TABELA 2). Entretanto, este não é um resultado esperado, uma vez que o crescimento das plantas geralmente é fortemente impactado pela falta de N (TAIZ *et al.*, 2017). Em estudos com outras plantas medicinais, a omissão deste macronutriente impactou o crescimento de mudas de *Achillea collina* (GIORGI *et al.*, 2009), *Achillea millefolium* (ALVARENGA *et al.*, 2015) e *Cymbopogon citratus* (LIMA *et al.*, 2019).

De acordo com a Figura 2 é possível observar clorose nas folhas mais velhas, sintomas semelhantes foram relatados em deficiência de N em *Cymbopogon citratus* (LIMA *et al.*, 2019). A clorose é um sintoma típico da deficiência de N, uma vez que este nutriente está associado à produção dos pigmentos fotossintetizantes (MALAVOLTA, 2006; MARSCHNER, 2012). Uma vez que o nitrogênio é componente estrutural da molécula de clorofila, o nitrogênio está diretamente ligado à capacidade fotossintética das plantas (MARENCO; LOPES, 2009). Além disso, o nitrogênio é um macronutriente utilizado na biossíntese de aminoácidos e proteínas, essencial ao crescimento das plantas (FREITAS *et al.*, 2011; TAIZ *et al.*, 2017).

Figura 2 - Plantas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* cultivadas nas diferentes soluções nutritivas.



Fonte: Da autora (2021).

As plantas cultivadas sob omissão de fósforo (P) apresentaram morte das folhas rasteiras e necrose em algumas partes da folha. O fósforo atua na produção de energia pelo metabolismo vegetal, uma vez que é um constituinte da molécula de ATP (adenosina trifosfato), necessário para o crescimento e desenvolvimento da planta, assim como é essencial para a produção de moléculas de RNA e DNA (TAIZ *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2014). Além disso, a deficiência de P pode causar redução na produção de proteínas e ácidos nucleicos, comprometendo o crescimento celular (MARSCHNER, 2012).

A omissão de potássio (K) levou ao aparecimento de clorose internerval e necrose na ponta das folhas mais velhas. Sintomas semelhantes foram observados em *Achillea millefolium* após 32 dias de cultivo sob omissão deste macronutriente (ALVARENGA *et al.*, 2015). Além disso o potássio é essencial para o metabolismo da planta, regulando a abertura estomática, o potencial osmótico, regulação do pH no interior das células vegetais, assim como a fotossíntese (MALAVOLTA, 2006; MARSCHNER, 2012). O potássio também está diretamente ligado à resistência a doenças e tolerância a secas (HAFSI; DEBEZ; ABDELLY, 2014; WANG; WU, 2013).

A deficiência de Cálcio (Ca) causou o aparecimento de pontos necróticos e uma redução de 87% na matéria seca total (TABELA 1 e FIGURA 2). O cálcio participa de funções celulares de sustentação como a formação da parede celular e tem grande importância no processo de divisão celular (MASCARENHAS, 2014; VEIGAS *et al.*, 2014). Alvarenga *et al.* (2015) ao analisarem a omissão de Ca em mudas de *Achillea millefolium* observaram uma redução de 92% da matéria seca em plantas cultivadas comparadas ao tratamento controle. Em *Lippia gracilis* a menor matéria seca da parte aérea foi encontrada nas plantas cultivadas com omissão de Ca, as quais apresentaram clorose e necrose das folhas (ALMEIDA *et al.*, 2018).

A omissão do magnésio (Mg) levou à clorose e morte das folhas baixas (FIGURA 2). O Mg faz parte da estrutura em anel da molécula de clorofila, tem participação na ativação de enzimas no processo de respiração, fotossíntese e síntese de DNA e RNA. Sua falta, geralmente leva aos sintomas observados neste estudo, a qual ocasiona clorose internerval das folhas mais velhas (MALAVOLTA, 2006). Sintomas semelhantes foram observados em *Achillea millefolium* (ALVARENGA *et al.*, 2015).

A deficiência de enxofre (S) não foi limitante e não causou danos às plantas, sendo estatisticamente igual ao tratamento controle (TABELA 2). Os sintomas mais comuns encontrados cultivadas em plantas em ambientes com deficiência deste macronutriente é a clorose generalizada das folhas mais velhas (MALAVOLTA, 2006). Entretanto, este sintoma não foi observado em mudas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. A omissão de enxofre não

afetou o crescimento de plantas de *Helianthus annuus* cultivadas em sistema hidropônico (PRADO; LEAL, 2006) e *Saccharum* ssp. (VALE *et al.*, 2011). Vale *et al.* (2011) ressaltam que o crescimento de *Saccharum* ssp. não foi influenciado pela deficiência de S devido à baixa extração deste macronutriente no solo pela planta. A espécie avaliada e a susceptibilidade à deficiência de dado nutriente podem levar a uma maior eficiência no uso de macro e micronutrientes (PRADO; LEAL, 2006).

A omissão do ferro (Fe) levou à morte das folhas mais velhas (FIGURA 2). O ferro é utilizado pela planta em diversas etapas do metabolismo, como crescimento e desenvolvimento, produção de clorofila, respiração celular e crescimento da raiz (LI; WANG; YANG, 2015; MARENCO; LOPES, 2009).

A omissão de zinco (Zn) levou à morte das folhas mais velhas (FIGURA 2). É possível observar que a ausência de Zn foi mais prejudicial às plantas, ocasionando uma perda generalizada das folhas baixas e apresentando pontos de clorose na parte superior das folhas. O zinco está associado às atividades enzimáticas nos vegetais e na biossíntese de clorofila (TAIZ *et al.*, 2017; YADEGARI; SHAKERIAN, 2014).

Alvarenga *et al.* (2015) observaram redução da matéria seca total em mudas de *Achillea millefolium* cultivadas sob omissão do macronutriente em comparação com o tratamento controle. Os autores também observaram menor crescimento da raiz, corroborando os resultados deste estudo, no qual observou-se uma redução de 81,5% da matéria seca da raiz em relação ao tratamento controle (TABELA 2).

A omissão de boro (B) causou enrugamento das folhas novas, clorose e morte das folhas mais velhas (FIGURA 2). O boro é considerado um dos nutrientes responsáveis pela manutenção da integridade estrutural das folhas (TAIZ *et al.*, 2017).

Observou-se o aparecimento de pontos necróticos nas folhas mais velhas e morte nos tratamentos com omissão de Mn e Cu (FIGURA 2).

A Tabela 2 apresenta os dados de comprimento e largura das folhas, assim como a área foliar obtida nos tratamentos de cultivo hidropônico de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* com omissão de macro e micronutrientes. Foi observada influência dos macro e micronutrientes nos parâmetros avaliados. As folhas são consideradas partes mais importantes da *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*, por possuir cardenolídeos cardiotônicos em sua parte aérea, metabólito secundário de interesse medicinal.

De acordo com os resultados deste experimento, a deficiência de enxofre (S) e manganês (Mn) foram responsáveis pelo aumento de 1,65 vezes e 1,52 vezes em comprimento, respectivamente, em comparação com o tratamento contendo todos os nutrientes (Completo).

A largura das folhas foi beneficiada pela omissão de S, B e Mn, com aumento de 2,9 cm, 1,8 cm e 2,1 cm, respectivamente, em relação às plantas cultivadas no tratamento Completo. A área foliar também foi influenciada pela omissão de nutrientes, onde as maiores áreas foliares foram observadas sob deficiência de S (109,96 cm²), B (69,81 cm²) e Mn (83,48 cm²) (TABELA 3).

Tabela 3 - Comprimento de folha e largura de folha de plantas jovens de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* cultivadas em solução nutritiva com omissão de macronutrientes e micronutrientes. Lavras, MG, 2021.

Tratamento	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Área Foliar (cm ² /planta)
Completo	14,0±6,4 c	4,1±1,7 c	39,03±8,5 c
- N	17,9±7,6 b	5,3±2,5 b	64,51±9,6 b
- P	16,0±6,6 b	4,8±2,7 b	52,22±12,4 b
- K	15,9±3,6 b	5,1±3,2 b	55,14±10,5 b
- Ca	10,4±4,9 c	2,6±1,1 d	18,39±9,2 d
- Mg	12,8±2,5 c	3,5±1,9 c	30,46±8,6 c
- S	23,1±4,2 a	7,0±2,1 a	109,96±11,3 a
- Fe	10,6±3,6 c	2,9±1,4 d	20,90±4,7 d
- Zn	14,2±4,1 c	4,4±1,2 c	42,49±12,5 c
- B	17,4±4,7 b	5,9±1,5 a	69,81±13,4 a
- Mn	19,8±5,2 a	6,2±1,9 a	83,48±19,2 a
-Cu	11,0±4,1 c	3,5±1,0 c	26,18±8,1 c
CV (%)	28,36	29,58	28,12

Fonte: Da autora (2021).

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade

3.2 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes

A quantificação de pigmentos fotossintetizantes em folhas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* foram afetadas significativamente pela omissão dos macro e micronutrientes (TABELA 4).

Tabela 4 - Clorofila *a* e *b*, clorofila total, carotenoides e relação *a/b* de plantas jovens de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii* cultivadas em solução nutritiva com omissão de macronutrientes e micronutrientes. Lavras, MG, 2021.

(Continua)

Tratamento	Chl a (mg/g MF)	Chl b (mg/g MF)	Chl total (mg/g MF)	Relação a/b	Carotenoide (mg/g MF)
Completo	0,129±0,04 a	2,064±0,61 a	2,193±0,47 a	0,06±0,03 c	0,268±0,09 b
-N	0,113±0,05 a	0,946±0,34 c	1,059±0,25 c	0,12±0,04 a	0,351±0,04 a
-P	0,162±0,09 a	1,782±0,36 a	1,944±0,54 a	0,09±0,04 b	0,359±0,05 a
-K	0,098±0,08 a	1,693±0,34 a	1,791±0,32 b	0,06±0,03 c	0,339±0,09 a
-Ca	0,092±0,09 a	1,327±0,45 b	1,419±0,43 b	0,07±0,04 c	0,285±0,08 b

Tabela 4 - Clorofila *a* e *b*, clorofila total, carotenoides e relação *a/b* de plantas jovens de *Digitalis mariana* ssp *heywoodii* cultivadas em solução nutritiva com omissão de macronutrientes e micronutrientes. Lavras, MG, 2021.

(Conclusão)					
Tratamento	Chl a (mg/g MF)	Chl b (mg/g MF)	Chl total (mg/g MF)	Relação a/b	Carotenoide (mg/g MF)
-Mg	0,091±0,07 a	1,052±0,36 c	1,143±0,54 c	0,09±0,05 b	0,265±0,07 b
-S	0,077±0,07 a	1,391±0,14 b	1,468±0,56 b	0,06±0,02 c	0,268±0,08 b
-Fe	0,076±0,05 a	1,261±0,23 b	1,337±0,33 b	0,06±0,02 c	0,267±0,09 b
-Zn	0,092±0,06 a	1,052±0,42 c	1,144±0,23 c	0,09±0,03 b	0,309±0,05 a
-B	0,102±0,06 a	1,560±0,21 a	1,662±0,29 b	0,07±0,03 c	0,343±0,06 a
-Mn	0,156±0,04 a	1,540±0,20 a	1,696±0,31 b	0,10±0,03 b	0,304±0,06 b
-Cu	0,101±0,08 a	1,761±0,32 a	1,862±0,19 a	0,06±0,02 c	0,371±0,08 a
CV (%)	33,3	12,92	17,21	15,02	10,07

Fonte: Da autora (2021).

*Chl: clorofila. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação a clorofila *a* é possível observar que não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância, em relação ao tratamento completo, demonstrando que a limitação dos macro e micro nutrientes não influenciou na produção de clorofila *a*. Entretanto, para clorofila *b* a ordem crescente de limitação foi N = Mg = Zn > Fe = Ca = S > Mn = B = K = Cu = Completo; para clorofila total foi N = Mg = Zn > Fe = Ca = S = B = Mn = K > Cu = P = Completo e para carotenoide foi Mg = Fe = S = Completo = Ca = Mn > Zn = K = B = N = P = Cu.

Observa-se que a omissão de N, Mg e Zn foram os que propiciaram os menores valores de clorofila total. O nitrogênio e magnésio fazem parte da estrutura da molécula de clorofila, sendo um nutriente essencial para a formação deste pigmento fotossintetizante (TAIZ *et al.*, 2017). Já o zinco é responsável pelo controle de atividades fisiológicas, estando diretamente ligado ao teor de clorofila nas folhas e, conseqüentemente, influenciando a sua fotossíntese (YADEGARI; SHAKERIAN, 2014).

Em plantas de *Achillea millefolium* a ausência de zinco (Zn) causou a redução do teor de clorofila em relação ao controle (ALVARENGA *et al.*, 2015), resultados semelhantes ao observado neste estudo, o qual observou-se uma redução de 47,83% no valor de clorofila total. Ao estudar plantas de *Lippia gracilis* (ALMEIDA *et al.*, 2018).

3.3 Determinação de proteínas totais

É possível observar o efeito da omissão de macro e micronutrientes no teor de proteínas totais (mg mL^{-1}) de folhas jovens de *Digitalis purpurea* ssp. *heywoodii* (TABELA 5). Houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, sendo a deficiência de boro (B) e magnésio (Mg) responsáveis pelo maior valor relatado quanto ao acúmulo de proteínas totais em plantas da espécie, com 0,066 e 0,062 mg mL^{-1} , respectivamente. De acordo com Uluisik *et al.* (2011), o boro é um micronutriente essencial para as plantas e regula o gene ATR1, envolvido na rota biossintética de aminoácidos e proteínas.

Tabela 5 - Efeito da omissão de macronutrientes e micronutrientes no teor de proteínas totais (mg mL^{-1}), cardenólídeos totais ($\text{g}/100\text{g}$ de folhas secas) e acúmulo de GEV ($\mu\text{g}/100\text{g}$ de folhas secas) de plantas de *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. Lavras, MG, 2021.

Tratamento	Proteínas Solúveis Totais (mg mL^{-1}) MSF	Cardenólídeos totais ($\text{g}/100\text{g}$)	GEV ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Completo	0,027±0,004 e	1,78±0,02 a	11,5±0,3 c
- N	0,020±0,003 e	1,75±0,04 a	7,7±0,9d
- P	0,025±0,005 e	1,66±0,14 a	18,9±2,2 b
- K	0,050±0,008 b	1,94±0,15 a	21,8±3,4 a
- Ca	0,057±0,010 b	0,90±0,04 c	1,98±0,3 j
- Mg	0,062±0,010 a	0,95±0,07 c	7,0±0,9e
- S	0,013±0,009 f	1,77±0,34 a	4,9±0,3 g
- Fe	0,030±0,011 d	1,07±0,15 c	3,0±0,3 h
- Zn	0,039±0,008 c	1,44±0,27 b	2,6±0,4 i
- B	0,066±0,009 a	1,43±0,18 b	5,5±0,3 f
- Mn	0,057±0,011 b	1,39±0,20 b	0±0 k
-Cu	0,040±0,003 c	1,03±0,11 c	5,2±0,5 g
CV (%)	13,76	11,81	4,04

Fonte: Da autora (2021).

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que a ordem crescente de limitação foi S > P = N = Completo > Fe > Zn = Cu > K = Mn = Ca > B = Mg. Assim, observou-se que a deficiência de enxofre (S) impactou expressivamente a produção de proteínas nas plantas. O enxofre é um macronutriente essencial para a produção de aminoácidos e proteínas (TAIZ *et al.*, 2017). Desta forma, sua falta levou a uma menor produção de proteínas, causando uma queda de 51,9% em relação ao tratamento controle com todos os nutrientes.

3.4 Análises quantitativas de cardenólídeos totais e GEV

De forma geral, analisa-se que a limitação dos macro e micronutrientes impactou o acúmulo de cardenólídeos totais na seguinte ordem $Cu = Fe = Mg = Ca > Mn = B = Zn > S = K = P = N = \text{Completo}$ (TABELA 5). Assim, a omissão de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e enxofre (S) não impactaram o teor de cardenólídeos totais. A deficiência de N, P, K e S pode resultar em maior produção de metabólitos secundários derivados do ácido chiquímico (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

De acordo com Pérez-Alonso *et al.* (2009) espécies de *Digitalis* podem sofrer limitações no cultivo devido a condições de solo e adubação. Em *Digitalis thapsi* cultivadas *in vitro*, houve influência da nutrição com cálcio e presença de luz (CACHO *et al.*, 1999). Para *Digitalis obscura*, adubações com N, P, K e Cu foram negativamente correlacionados com o acúmulo de cardenólídeo, ao passo que doses de Fe e Mg foram positivamente correlacionadas com as concentrações de cardenólídeos (ROCA-PÉREZ *et al.*, 2005).

Tsao, Gomes e Chaubal (1961) observaram que o aumento da disponibilidade de K para em *Digitalis lanata* diminuiu o acúmulo de cardenólídeos totais, indicando uma ligação entre o potássio e acúmulo de cardenólídeos. Neste estudo, foi possível observar que, ao limitar o potássio, o acúmulo do cardenólídeo GEV aumentou em 1,89 vezes em relação ao tratamento controle. Observou-se, também, que a omissão de manganês (Mn) inibiu a produção deste cardenólídeo digitalico (TABELA 5). Isso indica que o Mn é um micronutriente importante para a síntese de GEV, além dos outros elementos como Fe, Zn, B e Cu.

Os macronutrientes mais limitantes para a síntese de GEV foram $Ca > S > Mg > N$ e os micronutrientes foram $Mn > Zn > Fe > Cu > B$.

A produção dos metabólitos secundários ocorre em resposta ao ambiente, podendo ser intensificada em condições de estresse para adaptação da planta, devido à sua plasticidade (TAIZ *et al.*, 2017). Em *Achillea millefolium*, a deficiência de P causou aumento de 71% na produção de óleo essencial (ALVARENGA *et al.*, 2015). Já em *Lippia gracilis*, foi relatado aumento no teor de carvacrol e timol em óleo essencial de plantas cultivadas em ambiente com omissão de N, P e K (ALMEIDA *et al.*, 2018).

Assim, verifica-se que cada espécie possui uma forma distinta de se adaptar e produzir metabólitos secundários. Os efeitos causados pela falta de nutrientes não são previsíveis e não seguem um padrão. Entretanto, o estresse nutricional tende a aumentar as concentrações dos metabólitos secundários com exceção do nitrogênio e enxofre, em que a ausência tende a reduzir o acúmulo destes metabólitos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Apesar de não terem

sido os piores valores, plantas cultivadas em deficiência de N e S tiveram redução no teor de GEV de 33,0% e 57,4%, respectivamente.

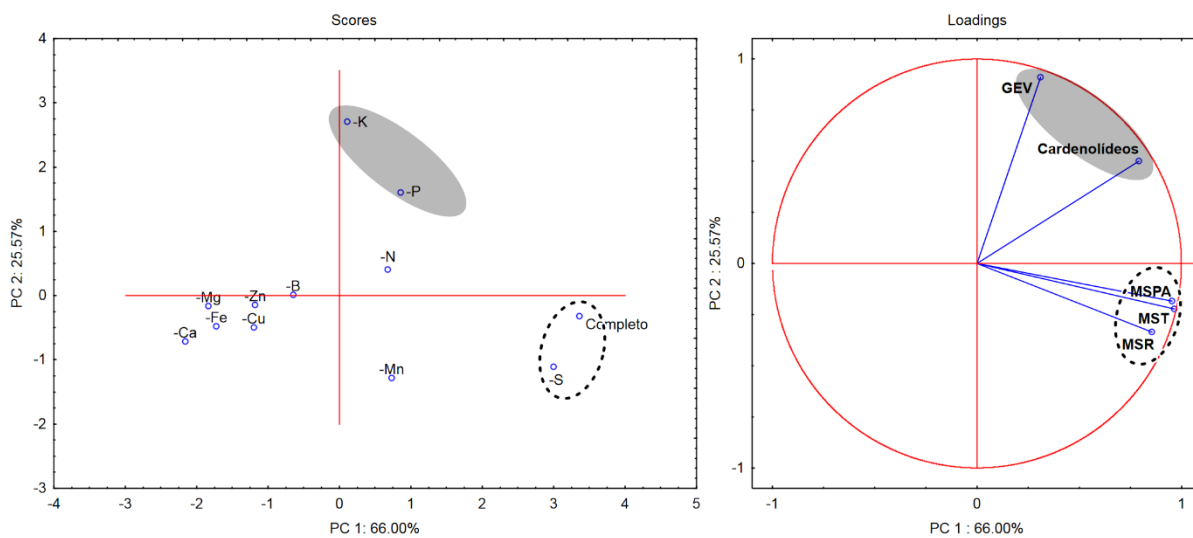
3.5 Análise dos Componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica da estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais. Assim, pode mostrar como os dados foram estruturados, correlação entre os dados, observar os outliers e, assim, dando uma visão geral do comportamento dos dados.

A PCA apresenta a correlação entre o crescimento vegetativo, cardenólídeos totais e glicoevatromonossídeo (GEV) com os macros e micronutrientes, explicando 91,57% da variação total (Figura Y). Assim, com o uso das PC1 (66,00%) e PC2 (25,57%) foi possível identificar a separação dos tratamentos em dois grupos. Onde o tratamento completo com os nutrientes e com a omissão de enxofre (-S) ocorreu maior acúmulo de matéria seca e com a ausência de potássio (-K) e de fósforo (-P) acúmulo de GEV e cardenólídeos totais.

A PCA permitiu identificar a correlação positiva entre o acúmulo de matérias secas com a solução nutritiva completa e com a omissão de -S, mostrando que ausência desses elementos não afetaram a síntese dos cardenólídeos e, de forma negativa com as soluções nutritivas com a ausência dos micronutrientes (-Zn, -B, -Fe, -Cu) e com os macronutrientes (-Ca, -Mg). Isto indica que estes elementos são importantes para a síntese de GEV e cardenólídeos totais. Assim trabalhos precisam ser realizados com dosagens diferentes desses elementos para observar o acúmulo desses cardenólídeos. Os resultados da PCA complementam as análises e interpretações anteriores.

Figura 3 - Análise de componentes principais (PCA) da correlação matricial entre crescimento vegetativo, pigmentos fotossintetizantes, proteína solúveis totais, cardenólídeos totais e glicoevatromonosídeo (GEV) com as malhas coloridas azul, vermelha, preta e tratamento a pleno sol.



Fonte: Da autora (2021).

4 CONCLUSÃO

O crescimento vegetativo, teor de proteínas, acúmulo de cardenólídeos e GEV são afetados pela disponibilidade de macro e micronutrientes. A deficiência de N, P, K e S não influencia o acúmulo de cardenólídeos totais, ao passo que a omissão de potássio aumenta a produção de GEV em 1,89 vezes em relação ao tratamento completo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B. R. *et al.* Macronutrient omission changes *Lippia gracilis* Schauer, a threatened medicinal plant, growth and volatile chemical composition. **HortScience**, Alexandria, v. 53, n. 12, p. 1877-1882, 2018.

ALVARENGA, I. C. A. **Lâminas de irrigação e omissão de nutrientes no cultivo in vivo e luz e TDZ na micropropagação e constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L.** 2013. 135 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ALVARENGA, I. C. A. *et al.* *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 122, p. 299-308, 2015.

BARNES, J. D. *et al.* A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 32, n. 2, p. 85-100, 1992.

BERTOL, J. W. *et al.* Anti-herpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 92, p. 73-80, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Madison, v. 72, p. 248, 1976.

CACHO, M. *et al.* Effect of calcium restriction on cardenolide accumulation in two cell lines of *Digitalis thapsi* grown under different light regimes. **Acta Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 21, p. 335-340, 1999.

CENTOFANTE, A. R. Light quality on the morphoanatomy and physiology of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. seedlings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 259, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030442381930651X>. Acesso em: 10 mar. 2021.

CLEMENTE, E. S. *et al.* *Digitalis*. In: KOLE, C. (ed.). **Wild crop relatives: genomic and breeding resources, plantation and ornamental crops**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 73-112.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FREITAS, M. S. M. *et al.* Sintomas visuais de deficiência de macronutrientes e boro em maracujazeiro-doce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 33, p. 1329-1341, 2011.

- GIORGI, A. *et al.* Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). **Food Chemistry**, Oxford, v. 114, n. 1, p. 204-211, 2009.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- HAFSI, C.; DEBEZ, A.; ABDELLY, C. Potassium deficiency in plants: effects and signaling cascades. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 36, p. 1055-1070, 2014.
- HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 347 p. (California Agricultural Experimental Station).
- KREIS, W.; HAUG, B.; YÜCESAN, B. Somaclonal variation of cardenolide content in Heywood's foxglove, a source for the antiviral cardenolideglucoevatromonoside, regenerated from permanent shoot culture and callus. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**, Wallingford, v. 51, p. 35-41, 2015.
- KRISHNA, A. B. *et al.* Plant Cardenolides in therapeutics. **International Journal of Indigenous Medicinal Plants**, London, v. 48, n. 2, p. 1871-1896, 2015.
- LI, H.; WANG, L.; YANG, Z. M. Co-expression analysis reveals a group of genes potentially involved in regulation of plant response to iron-deficiency. **Gene**, Amsterdam, v. 554, p. 16-24, 2015.
- LIMA, T. C. *et al.* Visual symptoms of macronutrient and boron deficiency in *Cymbopogon citratus*. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 42, n. 13, p. 1430-1438, 2019.
- LUCKNER, M.; WICHTL, M. **Digitalis: geschichte, biologie, chemie, physiologie, molekularbiologie, pharmakologie, medizinische anwendung**. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2000.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.
- MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2009.
- MARSCHNER, P. **Mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. New York: Academic, 2012. 649 p.
- MASCARENHAS, Y. S. **Diagnose por subtração de nutrientes em mudas de tomate para processamento industrial**. 2014. 83 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

NAVARRO, E. *et al.* Cardiovascular activity of a methanolic extract of *Digitalis purpurea* ssp. *heywoodii*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 71, n. 3, p. 437-442, 2000.

PATIL, J. G. *et al.* In vitro propagation and production of cardiotoxic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 6, p. 2379-2393, 2013.

PÉREZ-ALONSO, N. P. *et al.* Cardiotoxic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 151-156, 2009.

PRADO, R. M.; LEAL, R. M. Desordens nutricionais por deficiência em girassol var. Catissol-01. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 187-193, 2006.

ROCA-PÉREZ, L. *et al.* Relationships among soil characteristics, plant macronutrients, and cardenolide accumulation in natural populations of *Digitalis obscura*. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tharandt, v. 168, p. 774-780, 2005.

SANTOS, R. P. *et al.* Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Ceres**, Viçosa, MG, v. 55, n. 4, p. 356-364, 2008.

SILVA, G. M. da. **Adubação orgânica, micropropagação e validação analítica para doseamento de cardenólídeos totais em *Digitalis purpurea* subs. *heywoodii***. 2017. 105 p. Tese (Doutorado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

TSAO, D. P. N.; GOMEZ, L. M.; CHAUBAL, M. G. Effect of potassium, nitrogen, and phosphorus on the growth and glycoside accumulation in *Digitalis lanata* L. leaf yield and total glycosides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, DC, v. 50, n. 9, p. 801-802, 1961.

ULUISIK, I. *et al.* Boron stress activates the general amino acid control mechanism and inhibits protein synthesis. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 11, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0027772>. Acesso em: 10 mar. 2021.

VALE, D. W. do *et al.* Omissão de macronutrientes na nutrição e no crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 2, p. 189-196, 2011.

VERMA, S. K. *et al.* In vitro culture of *Digitalis* L. (Foxglove) and the production of cardenolides: an up-to-date review. **Industrial Crops and Products**, London, v. 94, p. 20-21, 2016.

VIEGAS, I. de J. M. *et al.* Mineral composition and visual symptoms of nutrients deficiencies in Curaua plants (*Ananas comosus* 'var.' *erectifolius*). **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 8, n. 5, p. 747-753, 2014.

WANG, Y.; WU, W. H. Potassium transport and signaling in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 451-476, 2013.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

YADEGARI, M.; SHAKERIAN, A. Effects of micronutrients foliar application on essential oils of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Advances in Environmental Biology**, Amman, v. 8, n. 4, p. 1063-1068, 2014.

ZHANG, D. *et al.* Physiological and genetic responses to boron deficiency in *Brassica napus*: a review. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 60, p. 304-313, 2014.