

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO

**CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA, FITOQUÍMICA E
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DE *Lippia*
origanoides H.B.K**

SIMONE TELES

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO – 2014

**CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA, FITOQUÍMICA E
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DE *Lippia
origanoides* H.B.K**

SIMONE TELES

Engenheira Agrônoma
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, 2008

Tese submetida ao Colegiado do Curso de Pós-
Graduação em Ciências Agrárias da
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
como requisito parcial para obtenção do Grau
de Doutor em Ciências Agrárias, Área de
Concentração: Fitotecnia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Franceli da Silva

Co-orientadores: Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Dra. Angélica Maria Lucchese

Dr. José Alberto Pereira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

T269c

Teles, Simone.

Cultivo e caracterização agronômica, fitoquímica e da atividade antioxidante e antifúngica de *Lippia origanoides* H.B.K / Simone Teles Braga._ Cruz das Almas, BA, 2014. 136f.; il.

Orientadora: Franceli da Silva.

Coorientador: Lenaldo Muniz de Oliveira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Plantas medicinais – Cultivo. 2.Plantas medicinais – Essências e óleos essenciais. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Lucchese, Angélica Maria. III.Pereira, José Alberto. IV.Título.

CDD: 581.634



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
SIMONE TELES BRAGA

Membro Presidente: Prof. Dr. José Alberto Pereira
Instituição: IPB

Membro Interno ao Programa: Profa. Dra. Ana Cristina Fermíno Soares
Instituição: UFRB

Membro Externo à Instituição: Profa. Dra. Maira Christina Marques Fonseca
Instituição: EPAMIG / MG

Membro Externo ao Programa: Profa. Dra. Cintia Armond
Instituição: UFRB

Membro Externo ao Programa: Prof. Dr. Paulo Lima Juiz
Instituição: UFRB

Homologada em / / .

Aos meus pais, Tânia e Vilobaldo, sem os quais nada disso seria possível.
A minha querida irmã Ana Paula, por sempre acreditar em mim, e meu querido
esposo, Robson, pelo amor, compreensão e incentivo em todos os momentos.

DEDICO

“Mas onde se achará a sabedoria?
E onde está o lugar do entendimento?
O homem não conhece o valor dela, nem se acha ela na terra dos viventes.
O abismo diz: Ela não está em mim; e o mar diz: Não está comigo. (...)
O ouro não se iguala a ela, nem o cristal;
ela não se trocará por jóia de ouro fino; (...)
Onde, pois, vem a sabedoria, e onde está o lugar do entendimento? (...)
Deus lhe entende o caminho, e ele é quem sabe o seu lugar.
Porque ele perscruta até as extremidades da terra,
vê tudo o que há debaixo dos céus.
Quando regulou o peso do vento e fixou a medida das águas; quando
determinou leis para a chuva e caminho para o relâmpago dos trovões,
então, viu ele a sabedoria e a manifestou;
estabeleceu-a e também a esquadrinhou.
E disse ao homem:
Eis que o temor do Senhor é a sabedoria,
e apartar-se do mal é o entendimento.”

Jó 28:12-28

AGRADECIMENTOS

Ao Super, Hiper, Mega orientador, Pai e amigo, Deus, por direcionar-me pelos melhores caminhos.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, representada pelos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pelo conhecimento transmitido e exemplo profissional. A todos os funcionários que contribuíram na minha caminhada.

À professora Dra. Franceli da Silva, muito obrigada pela confiança, entusiasmo e a amizade demonstrados durante todo o tempo.

À professora Dra. Angélica Lucchese, pela paciência, prestatividade, disponibilidade e ensinamentos.

Ao professor Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira, pela paciência, disponibilidade, orientação, confiança e inestimável colaboração.

Ao professor Dr. José Alberto Pereira, pela orientação, amizade e sugestões pertinentes.

Aos funcionários do Horto Florestal, pelo apoio e infraestrutura para implantação do projeto.

À equipe do Laboratório de Produtos Naturais-LAPRON da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFES, especialmente a Edna, pelo apoio e realizações das análises.

Ao pesquisador Carlos Ledo, pela orientação com as análises estatísticas.

Ao bolsista de iniciação científica, Flávio Nery, que muito me ajudou. Agradeço em especial todos os momentos compartilhados no campo e no laboratório, muitos construtivos, além daqueles em descontração.

Aos portugas Ricardo Malheiro, Nuno Miguel, Ivo, Eric Pereira e Maria, pelos momentos de companheirismo, ensinamento, auxílio, paciência e disponibilidade; serei eternamente grata a vocês.

À Equipe do laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em especial ao Rafael Mota, pela ajuda fundamental na execução do trabalho.

Aos meus amigos e colegas do doutorado: Ariana Reis, Micaele Costa, Anderson Carvalho, Bianca Oliveira, Daniel Silva, Vanessa Almeida, José Augusto, Erasto Gama, Carine Oliveira, Isabela Araújo, pela amizade, auxílio, conselho e incentivo.

Às agências Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, Programa Ciências sem Fronteiras – CsF/CNPQ, e Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP.

Aos amigos não acadêmicos, que caminharam junto comigo nesse período, e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse alcançar mais uma conquista, obrigado! Sejam sempre abençoados.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMO | |
| ABSTRACT | |
| INTRODUÇÃO..... | 11 |
| Capítulo 1 | |
| CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia origanoides</i> H.B.K. EM FUNÇÃO DO TIPO DE ADUBAÇÃO E DA ÉPOCA DE COLHEITA..... | 39 |
| Capítulo 2 | |
| COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia origanoides</i> H.B.K EM FUNÇÃO DO TIPO DE ADUBAÇÃO E DA ÉPOCA DE COLHEITA..... | 70 |
| Capítulo 3 | |
| EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>LIPPIA ORIGANOIDES</i> H.B.K NO CONTROLE <i>IN VITRO</i> DE <i>Aspergillus niger</i> , ISOLADO DO SISAL (<i>Agave sisalana</i>)..... | 114 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 135 |

CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA, FITOQUÍMICA E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DE *Lippia origanoides* H.B.K

Autora: Simone Teles

Orientadora: Dra. Franceli da Silva

RESUMO: O trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento, bem como o teor, o rendimento, a composição química e a atividade bioativa do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. Foram utilizadas plantas cultivadas em área experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, colhidas nos meses de janeiro, abril, julho e outubro, entre 8 e 9 horas da manhã. Para extração do óleo essencial, as folhas/inflorescência secas foram submetidas à hidrodestilação durante 3 horas, sendo o óleo essencial extraído e analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotometro de massas (GC-DIC e GC-EM). No teste de biotividade do óleo essencial foram realizados ensaios para determinar a atividade antioxidante utilizando-se de três métodos: Poder Redutor; captura dos radicais 2,2-diphenylpicrylhy-drazil-(DPPH) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfô-nico)-ABTS; e atividade antifúngica, sob o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos do *Aspergillus niger* van Tieghem. Nas condições em que foi realizado o estudo, pode-se concluir que: a) A época de colheita afeta o crescimento, o teor e o rendimento de óleo de *Lippia origanoides*; b) A adubação mineral favorece o maior acúmulo de biomassa de folhas, inflorescências e conseqüentemente maior rendimento de óleo essencial; c) Temperatura e umidade são os fatores que mais afetam o teor de óleo essencial de *Lippia origanoides*; d) O maior rendimento de óleo pode ser obtido nos meses de julho e outubro; e) O óleo de *Lippia origanoides* apresenta como compostos majoritários: carvacrol, linalol, p-cimeno; γ -terpineno, (E)-cariofileno, biciclogermacreno e timol; f) época de colheita influencia a concentração dos dois principais componentes do óleo essencial da *Lippia origanoides*, sendo que o linalol aumenta ao longo do tempo de cultivo e o carvacrol tem sua concentração reduzida; g) A adubação das plantas de *Lippia origanoides* promove aumento das concentrações do p-cimeno, timol; h) Os testes de DPPH, Poder Redutor e ABTS comprovam o potencial antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides*; j) O óleo essencial de *Lippia origanoides* obtido em quatro épocas distintas de colheita, possui efeito fungitóxico perante a inibição no crescimento micelial de *Aspergillus niger*; l) As diferentes concentrações utilizadas do óleo essencial inibem o crescimento micelial *A. niger*; m) As maiores concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides* proporcionam maiores taxas de inibição da germinação dos esporos; n) Os testes *in vitro* indicam o potencial de uso do óleo essencial de *Lippia origanoides* no controle de *Aspergillus. niger*.

Palavras-chave: cultivo; Verbenaceae, óleo essencial, atividade biológica.

CULTIVATION AND CHARACTERIZATION OF AGRONOMIC, PHYTOCHEMICAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ANTIFUNGAL OF *Lippia organoides* H.B.K

Author: Simone Teles

Supervisor: Dra. Franceli da Silva

ABSTRACT: The present work had the main goal to evaluate the growth, as well as the content, yield, chemical composition and bioactivity of the essential oil from *Lippia organoides* H.B.K. In the research were used plants cultivated in the experimental area of Horto Florestal of the State University of Feira de Santana, harvested in the months of January, April, July and October, between 8 and 9 a.m.. To obtain the essential oils, dried flowers and inflorescences were submitted to hydro-distillation for 3 hours, being the essential oil extracted by gas chromatography (GC/FID and GC/MS). In order to test essential oils bioactivity were realized assays to determine the antioxidant activity by three different chemical assays: reducing power, scavenging capacity of 2,2-diphenylpicrylhydrazil (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) diammonium salt (ABTS); the antifungic activity over the growth of *Aspergillus niger* van Tieghem was also tested. In the conditions that the study was conducted it can be concluded that: a) harvest moment affect growth, essential oil content and yield from *Lippia organoides*; b) mineral fertilization enables a higher accumulation of leaves biomass, inflorescences and consequently higher essential oil yield; c) temperature and humidity are factors that affect more essential oil content of *Lippia organoides*; d) highest essential oil yield can be obtained in the months of July and October; e) *Lippia organoides* is mainly composed by carvacrol, linalool, ρ -cymene, γ -terpinene, (E)-caryophyllene, bicyclogermacrene, and thymol; f) harvest moment influence the concentration of the two most abundant compounds found in the essential oil of *Lippia organoides*, since linalool increase during plant cultivation and carvacrol reduce its concentration; g) *Lippia organoides* plants fertilization enhances the concentrations of ρ -cymene and thymol; h) DPPH, reducing power and ABTS assays prove the antioxidant potential of *Lippia organoides* essential oils; j) *Lippia organoides* essential oil obtained from four harvest seasons, reveals fungitoxicity over the inhibition growth of mycelia of *Aspergillus niger*; l) the different concentration of essential oil used inhibited the mycelia growth of *A. niger*; m) the highest concentrations of essential oil of *Lippia organoides* provided higher inhibition rates in spores germination; n) *in vitro* assays indicated the potential use of *Lippia organoides* essential oil in the control of *A. niger*.

Keywords: cultivation, Verbenaceae, essential oil, biological activity

INTRODUÇÃO

1. Plantas medicinais: aspectos gerais

A preocupação com a cura das doenças existe desde os primórdios da humanidade. Por meio de observações, as primeiras civilizações descobriram nas plantas utilizadas na alimentação seu potencial curativo no combate às doenças (CUNHA, 2012). Através de várias tentativas e erros, as plantas tornaram-se conhecidas por suas propriedades, em especial as espécies medicinais. As civilizações antigas contribuíram de maneira eficaz no conhecimento das propriedades terapêuticas dos vegetais (ALMASSY JUNIOR et al., 2005). O Egito, China e a Índia deram origem as mais antigas obras sobre medicina e vegetais, sendo o papiro do Egito considerado o mais antigo da história da Medicina. No livro de Pen Tsao-Ching (2700 a.C), nos papiros (1500 a.C), bem como na bíblia, são encontradas diversas citações sobre o uso de ervas medicinais e preparações à base de produtos do Reino Vegetal (CARVALHO, 2004). No Brasil, o uso das plantas medicinais com fins terapêuticos foi evidenciado no País pelas culturas indígena, africana e europeia (ALMASSY JUNIOR et al., 2005).

O conhecimento popular, adquirido durante centenas de anos, e transmitido às gerações futuras por meio de relatos escritos e orais, tem beneficiado o homem, possibilitando a descoberta de novos medicamentos utilizados atualmente no tratamento de diversas enfermidades (SILVA e CARVALHO 2004; CALIXTO, 2000). As plantas, além do seu vasto uso na medicina popular, têm sido a base para formulações de vários fármacos, como a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina e a cada momento são citadas na literatura novas moléculas com ação farmacologia relevante como: a forskolina, o taxol e a artemisinina (CECHINEL FILHO, 1998).

Segundo os registros da Organização Mundial da Saúde – OMS (2000), 80% da população mundial faz uso de medicamentos derivados de plantas medicinais. Estima-se que dentro dessa porcentagem, apenas 30% dessas pessoas são orientadas por médicos na utilização dessas plantas. Devido ao amplo uso, as

áreas de fitoquímica, etnofarmacologia, farmacologia e toxicologia têm se tornado promissoras nos estudos voltados às plantas medicinais, juntas fornecem dados importantes para formulação e descobertas de novos fármacos (ARAÚJO et al., 2004).

O Brasil possui um cenário oportuno para o desenvolvimento de produtos fitoterapêuticos. Os dados estatísticos revelam que do total de espécies existentes no mundo (250-500 mil), o País detém cerca de 20% da flora, onde cerca de 10 mil são medicinais (CASTRO et al., 2004). Embora os números sejam propícios, as pesquisas multidisciplinares na área de plantas medicinais ainda não conseguiram atingir nem 10% do que precisa ser avaliado e esse número ainda é reduzido quando se trata dos aspectos biológicos (CALIXTO, 2003; CARVALHO, 2007). Logo, torna-se um país biologicamente rico, mas pouco explorado e/ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em outros países, a exemplo da Alemanha, Estados Unidos e Canadá (SOUSA et al., 2008).

É necessário e urgente o aumento de incentivos em pesquisas voltados para as plantas medicinais. Somente no Brasil este mercado movimenta em torno de 1 bilhão de reais/ano e emprega mais de 100 mil pessoas (ABIFISA, 2009), o que revela a importância econômica dos produtos naturais derivados de plantas (LUCHESSA et al., 2006). Além de contribuir com o aumento do Produto Interno Bruto-PIB, o que conduzirá ações que visem o uso racional dos recursos naturais. Outro aspecto importante é a descoberta de tratamentos eficazes e comprovação científica da utilização das plantas medicinais dos diferentes biomas brasileiros (OLIVEIRA, 2012). No semiárido, existem diversas espécies descritas em levantamentos etnofarmacológicos regionais que revelam grande riqueza do uso popular para os mais diversos fins (MATOS, 1998; JÚNIOR et al., 2005; AGRA et al., 2007). Contudo, dados recentes mostram que cerca de 80% dos fitoterápicos registrados no Brasil são oriundos de espécies estrangeiras (ABIFISA, 2009).

Vale salientar que os produtos naturais e seus derivados representam cerca de 50% das drogas utilizadas no mundo, sendo que as plantas medicinais contribuem com 25% deste total (FERNANDES; SANTOS; PIMENTA, 2005).

Apesar de toda droga existente no mercado, apenas 23% da população a consome, a maioria depende dos remédios caseiros obtidos de plantas (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005). Portanto, o Brasil, com a vasta riqueza de

sua flora, caracterizando um grande potencial de matéria-prima, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais (PINTO, 2008).

2. O gênero *Lippia* L.

Dentre as plantas aromáticas nativas do semiárido, destacam-se as espécies do gênero *Lippia*, pertencentes à família Verbenaceae. Essa família inclui aproximadamente 1.035 espécies reunidas em 36 gêneros, sendo encontrada nas Américas do Sul, Central e na África tropical (VICCINI et al., 2006). No Brasil, estima-se 296 espécies desta família, distribuídas em 22 gêneros (BARROSO et al., 1986 *apud* MELO et al., 2010). A maioria das espécies dessa família constitui plantas largamente utilizadas na medicina popular (*Aloysia gratissima*, *Aloysia sellowii*, *Aloysia triphylla*, *Lantana camara*, *Lippia alba*, *Lippia alnifolia*, *Lippia sidoides*, *Lippia thymoides*, *Stachytarpeta cayennensis*, *Verbena litoralis*) (LORENZI, 2008). *Lippia* é o segundo maior gênero da família, reunindo cerca de 200 espécies, onde o maior número se encontra no Brasil em campos rupestres e no cerrado (SALIMENA, 2000). Somente no semiárido brasileiro podem ser encontradas 35 espécies (GIULIETTI et al., 2006). Dentre essas espécies, muitas são aromáticas de características herbáceas, subarborescentes ou arbóreas de pequeno porte, distribuídas em diversas regiões do Brasil, principalmente na Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, Chapada Diamantina, na Bahia e Goiás (SALIMENA, 1991; SALIMENA, 2000).

O gênero *Lippia* destaca-se economicamente pela presença dos óleos essenciais, que conferem as espécies aromáticas diversas propriedades medicinais (SALIMENA, 2000). Os terpenoides presentes nos óleos essenciais são os principais agentes da ação terapêutica. Muitas espécies do gênero *Lippia* vêm sendo investigadas devido às propriedades antibacterianas, antifúngicas, larvicidas, anestésicas e inseticidas (LINDE et al., 2010). Os estudos que comprovam as propriedades biológicas das espécies deste gênero devem-se principalmente pela presença dos compostos: limoneno, β -cariofileno, p -cimeno, cânfora, linalol, α -pineno, timol e carvacrol, apresentados na Figura 1.

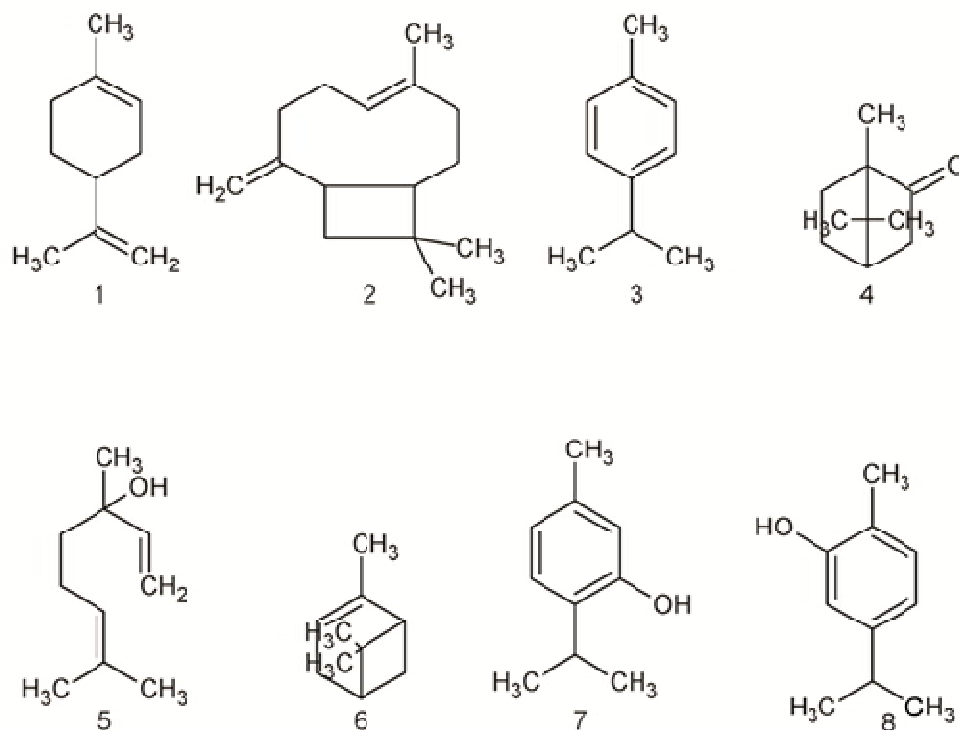


FIGURA 1: Estruturas moleculares de limoneno (1), β -cariofileno (2), p-cimeno (3), cânfora (4), linalol (5), α -pineno (6), timol (7), carvacrol (8).

Tradicionalmente essas espécies têm sido usadas por meio de decocção ou infusão e administração via oral. As folhas e flores da *Lippia lupulina* Cham. são utilizadas para tratar infecção bucal e de orofaringe (RODRIGUES e CARVALHO 2001); *Lippia alnifolia* Mart. e Schauer e *Lippia gracilis* Schauer têm uso como antisséptico tópico para dermatites e seborreia e também como antisséptico bucal (AGRA et al., 2007). *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brow, *Lippia graveolens* H.B.K, *Lippia organoides* H.B.K e outras seis espécies são utilizadas no tratamento da gripe, bronquite e asma. *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brow, *L. citriodora* (Ort.) H.B.K, *L. graveolens* H.B.K, *L. micromera* Shauer e *L. organoides* H.B.K são comumente usadas como condimento na preparação de alimentos (PASCUAL et al., 2001).

Muitos estudos têm comprovado a atividade farmacológica dessas espécies, que se concentram principalmente no tratamento de disfunções do sistema digestório ou respiratórias, hipertensão, condições nervosas e náuseas (COSTA et al., 2005; PASCUAL et al., 2001; SARRAZIN, 2012).

3. *Lippia origanoides* H.B.K

A *Lippia origanoides* H.B.K é uma espécie nativa do Brasil, encontrada nas diversas regiões do País, como no Norte (Pará, Amazonas), Nordeste (Bahia), Centro-oeste (Mato grosso, Goiás, Distrito Federal) e Sudeste (Minas Gerais, São Paulo), predominando principalmente em campos e cerrados de solos pedregosos e compactos, em altitudes entre 90 a 1100 metros acima do nível do mar (SALIMENA et al., 2010). Além do Brasil, esta espécie pode ser encontrada na Colômbia, Venezuela e Guiana (PASCUAL et al., 2001), sendo comum no semiárido brasileiro (MATOS,1998). No Brasil é conhecida popularmente como alecrim-do-tabuleiro, já na Colômbia é conhecida como alecrim da montanha (STASHENKO et al., 2010).

Foi descrita por García-Barriaga (1992) como sendo:

Um arbusto de 1 a 2 metros de altura, folhas ovadas com ápice arredondado, margens dentadas, pubescentes, com tricomas ferrugíneos, de 3,5 a 5 cm de largura, 1,5 a 2,3 cm de comprimento, pecíolo de 1-1,5 cm de largura. Inflorescências axilares, pequenas, brancas e forte aroma (Figura 2).



FIGURA 2. *Lippia origanoides* H.B.K

Tradicionalmente as folhas e flores de *Lippia origanoides* são utilizadas na medicina popular em forma de infusão no tratamento de dor de estômago, flatos e indigestão. Sendo utilizada também como expectorante em infecções nos brônquios e pulmões, recomendada contra asma, tuberculose, antiespasmódico (GARCÍA-BARRIAGA 1992; STASHENKO et al., 2010). Podem ser utilizadas ainda como decoto ou macerado em álcool, como utilizado nas Américas do Sul e Central, na África tropical e países da Europa no tratamento de distúrbios do sistema digestório (PASCUAL et al., 2001). As folhas e o óleo essencial extraído delas são indicados para inalação e o preparo do xarope a partir da infusão das folhas, também utilizado para o combate das doenças citadas acima (MATOS, 1998).

Devido ao grande potencial observado nesta espécie e pela grande utilização na medicina popular, algumas pesquisas têm sido realizadas para validar o conhecimento tradicional e descobrir novos usos. De acordo com trabalho feito por Stashenko et al. (2010) na Colômbia, os extratos de *Lippia origanoides* quimiotipo A, apresentaram excelentes resultados, o que faz esta planta

promissora para pesquisa com potenciais diversos, podendo ser utilizados em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos.

Lippia origanoides é uma espécie rica em óleo essencial, apresentando alta variabilidade quanto ao teor, entre 1,0% a 4,6% (OLIVEIRA et al., 2007; CAVALCANTE et al., 2009) da massa das suas folhas. Essa variação também pode ser observada na determinação dos seus compostos químicos, Stashenko et al. (2010) classificou a *Lippia origanoides* em três quimiotipos: quimiotipo A rico em carvacrol e timol, quimiotipo B rico em α - e β - felandreno e quimiotipo C rico em p-cimeno e limoneno. Os monoterpenos que geralmente se encontram em maiores quantidades são 1,8-cineol, α -terpineol, metil timol, sabineno, γ -terpineno, timol, carvacrol, p -pineno e os sesquiterpenos são β -cariofileno, nerolidol e α -humuleno (PASCUAL et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007; ESCOBAR et al., 2010).

A presença do carvacrol e timol conferem a *Lippia origanoides* ação antimicrobiana contra fungos e bactérias (HYLDGAARD et al., 2012). Trabalhos realizados por Oliveira e colaboradores. (2007), avaliando a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides*, observaram que o perfil químico foi constituído principalmente por sesquiterpenos, destacando-se o p -cimeno (10,3%), timol (18,5%) e carvacrol (38,6%), apresentando elevada atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum* T544, *Fonsecaea pedrosoi*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans*). Pinto et al. (2013) avaliando a atividade antimicrobiana de *Lippia origanoides* também encontraram resultados positivos para espécie estudada, sendo os extratos das folhas eficientes na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*. Meneses et al. (2009), em estudo feito na Colômbia, constataram a ação do óleo essencial de *Lippia origanoides* contra o vírus da febre amarela e Escobar et al. (2010) observaram atividade contra *Trypanosoma cruzi*, evidenciando o potencial da ação do óleo essencial não só contra bactérias e fungos, mas contra vírus e protozoários. Ainda em estudos realizados por Verbel et al. (2010); Bedoya et al. (2012), os autores constataram a capacidade do óleo essencial de *Lippia origanoides* em inibir os radicais livres, conferindo a essa espécie propriedades antioxidantes.

No Nordeste, através do Projeto Farmácias Vivas do Estado do Ceará, o alecrim-do-tabuleiro tem sido cultivado em comunidades carentes, devido as suas propriedades biológicas e eficácia terapêutica. Essa espécie constitui parte importante na promoção da atenção primária à saúde nestes locais (MATOS, 1998). Contudo, apesar de todo potencial para ser utilizado como produto farmacêutico, estudos agronômicos que permitam a viabilidade do uso dessa espécie ainda são escassos.

4. Cultivo de Plantas Medicinais

Diferentemente das demais culturas, no cultivo de plantas medicinais o interesse maior é pela produção dos metabólitos secundários, que são substâncias responsáveis por atividades biológicas produzidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente (DUDAREVA et al., 2004; PIMENTEL et al., 2005). A produção dessas substâncias pelas plantas é afetada por fatores relacionados ao cultivo, como a época de colheita da planta, fatores climáticos, como a umidade, luminosidade, parte da planta utilizada, método de transporte, armazenamento, secagem e processo de extração, o que pode modificar a composição química do material vegetal, limitando seu uso pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosmético (FERREIRA, 1998; CALIXTO, 2000).

Com o avanço do mercado de plantas medicinais é cada vez mais exigida uma matéria prima de qualidade e com possibilidade de serem produzidas em larga escala. Para atender à demanda do mercado é importante a adoção de procedimentos agrícolas que garantam o aumento da produção e qualidade do produto (CORRÊA JÚNIOR e SCHEFFER, 2001). Note-se que grande parte das plantas nativas do Brasil é obtida por meio do extrativismo.

O conhecimento das práticas agronômicas, principalmente para espécies nativas, envolvendo o cultivo, possibilitará o desenvolvimento da cadeia produtiva dessas plantas, garantindo a sustentabilidade de produção e consumo, possibilitando a conservação de suas populações naturais (FRANÇA, 2002). As práticas relacionadas ao cultivo, incluindo a adubação, podem favorecer a alta produtividade de biomassa e incrementar o teor de princípios ativos, solucionando

alguns dos problemas dos materiais provindos do extrativismo (MING et al., 2003).

4.1 Alguns fatores que influenciam o cultivo das plantas medicinais

4.1.2 Adubação

A disponibilidade de nutrientes no solo interfere no metabolismo primário e secundário das plantas medicinais (BIASI et al., 2009). Cada espécie tem exigências diferentes quanto à fertilidade do solo, mas a maioria se adapta melhor à solos leves e férteis, onde as raízes se desenvolvem com facilidade. A textura do solo pode ser modificada com adubação orgânica devido aos inúmeros benefícios decorrentes da aplicação de resíduos orgânicos ao solo. O efeito da aplicação de adubos orgânicos sobre a produção de plantas medicinais é amplamente discutido na literatura (CHAVES et al., 2002) .

Com relação à adubação mineral, essa situação não é diferente, principalmente para os macronutrientes N, P e K (RODRIGUES et al., 2004). Contudo, para as espécies medicinais nativas do semiárido e cerrado, poucas informações têm sido encontradas na literatura. O estudo do comportamento dessas espécies em condições de cultivo forneceria subsídios para um manejo racional dos recursos naturais, visando minimizar o extrativismo, além de criar novas perspectivas de renda para pequenos agricultores da região.

A influência da adubação, no desenvolvimento e produção de óleo essencial, tem sido demonstrada em diversas espécies medicinais. Oliveira et al. (2002), estudando o efeito da adubação mineral e orgânica sobre a produção de biomassa de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, observaram que a adubação orgânica foi suficiente para promover altas produtividades sem a necessidade da adubação mineral. Silva et al. (2003), estudando a mesma espécie, observaram maior rendimento de biomassa seca nos tratamentos com adubação orgânica + química e maior teor de óleo essencial nas plantas adubadas com adubo orgânico.

Ramos et al. (2005) afirmaram que houve incremento na produção de matéria seca de hortelã-rasteira (*Mentha x villosa* Huds.) com o aumento das doses de fósforo, no entanto, a adubação fosfatada não influenciou o teor de óleo essencial.

No trabalho feito com *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., utilizando adubação mineral, esterco bovino, esterco de aves, vermicomposto e composto orgânico, verificou-se que as plantas responderam bem às adubações mineral e orgânica aplicadas, com exceção do esterco bovino. O melhor desenvolvimento foi, entretanto, observado nas plantas adubadas com esterco de aves (MAIA et al., 2008). Já Biasi et al. (2009) constataram que a alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) respondeu pouco à adubação orgânica, e em relação à composição do óleo essencial, não foram encontradas diferenças marcantes em função da elevação dos níveis de adubação.

Souza et al. (2010) em estudos com *Lippia citridora* Kunth encontraram efeitos positivos da adubação orgânica no incremento da biomassa seca e fresca, sendo que o teor de óleo não foi influenciado pela adubação. Ali e colaboradores. (2012), trabalhando com tipos de adubo (mineral e orgânico) constataram o incremento da matéria seca da folha e caule e o aumento da esculina em *Cichorium intybus* L. Leite et al. (2013) também verificaram o incremento da produção de matéria seca e de óleo essencial em *Lippia sidoides* Cham com adubação orgânica.

Com base nos relatos acima, verifica-se que várias espécies medicinais, responderam positivamente à adubação. Para a maioria delas há efeitos benéficos sobre o crescimento de plantas e produção de óleo essencial.

4.1.3 Época de colheita

Outro fator que influencia no rendimento de óleo essencial de espécies aromáticas é a época de colheita (BEZERRA et al., 2008). As espécies medicinais, podem apresentar maior quantidade de princípio ativo em períodos específicos como em épocas do ano (REIS et al., 2003). Neste sentido, a colheita é um dos aspectos que deve ser observado na produção de plantas medicinais (Martins et al., 1994), buscando obter o máximo rendimento possível do princípio ativo de interesse e biomassa .

O óleo essencial da planta pode variar ao longo das estações, devido à fatores externos, como temperatura, pluviosidade, vento, latitude e altitude; interferindo no metabolismo secundário e conseqüentemente no teor de compostos bioativos (PINTO e BERTOLUCCI, 2002). Assim, muitos trabalhos

visam descobrir, para cada espécie e região geográfica, o momento ideal da colheita para plantas medicinais e aromáticas.

Castro et al. (2002), trabalhando com *Lippia alba* L., na região de São Paulo em diferentes estações do ano, observaram maiores teores médios de óleo essencial no outono (0,47%) e no inverno (0,43%), e o menor no verão (0,15%). Rojas et al. (2006), constataram em folhas coletadas de *Lippia organoides* nas estações seca e chuvosa no Estado de Mérida, Venezuela, que o teor de óleo essencial não foi influenciado pela época de colheita.

Em capim citronela, Blank et al. (2007) observaram, para época de colheita, que o melhor rendimento de óleo essencial foi obtido na primavera. Deschamps et al. (2008) avaliando o rendimento de óleo essencial em espécies de menta em duas épocas de colheita (verão e inverno) concluíram que todas as cultivares apresentaram queda no rendimento de óleos essenciais quando colhidas no inverno.

Trabalhos feitos por Hussain et al. (2008) trabalhando com *Ocimum basilicum*, observaram maiores teores de óleo essencial no verão (0,27%) e menores na primavera (0,17%). Em *Hyptis marrubioides*, o mesmo efeito foi observado, no verão o teor de óleo foi superior em relação às outras estações.

A colheita das folhas de *Lippia organoides* na região da Colômbia apresentaram melhores rendimentos de óleo essencial (3,1%) e timol (80,3%) na estação seca em comparação com a estação chuvosa (BEDOYA et al., 2012)

As variações apresentadas de espécies medicinais em diferentes climas indicam a necessidade de pesquisas relacionadas às técnicas de manejo visando não só produção quantitativa de biomassa por unidade de área, mas também o teor ideal dos constituintes químicos de interesse.

5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, são produtos obtidos de plantas, caracterizados pela separação por arraste a vapor e produzidos em estruturas anatômicas e celulares definidas, como cavidades e tricomas glandulares. A designação de óleo se dá devido a algumas características físico-químicas como a de serem voláteis; lipofílicas; geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES et al., 2007). São substâncias solúveis

em solventes orgânicos (éter, álcool, clorofórmio e benzeno), são instáveis na presença de luz, umidade, calor e metais (CARDOSO, et al., 2001).

O conjunto de reações químicas que ocorrem nas células vegetais é responsável pela síntese dos metabólitos primários e secundários. Os nutrientes fundamentais para o crescimento e desenvolvimento da célula, tais como: carboidratos, lipídeos, proteínas, açúcares, aminoácidos, ácido nucléicos e seus polímeros derivados, fazem parte do seu metabolismo primário e são considerados essenciais à vida (CASTRO, 2004).

Todo processo de formação dos compostos primários inicia-se pela fotossíntese, onde os vegetais são capazes de sintetizar compostos orgânicos (açúcares) a partir de compostos inorgânicos (CO_2 e água) por meio de sucessivas reações anabólicas e/ou catabólicas, dando origem aos componentes essenciais para sobrevivência dos seres vivos. Tais compostos atuam como precursores dos metabólitos secundários (BIASI e DESCHAMPS, 2009).

A produção dos óleos essenciais ocorre em duas vias do metabolismo secundário: chiquimato (compostos aromáticos) e mevalonato (derivados dos terpenoides), sendo resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (CORAZZA, 2002). Os óleos são constituídos principalmente de terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) (CRAVEIRO e QUEIROZ, 1993; CASTRO et al., 2004)(Figura 3).

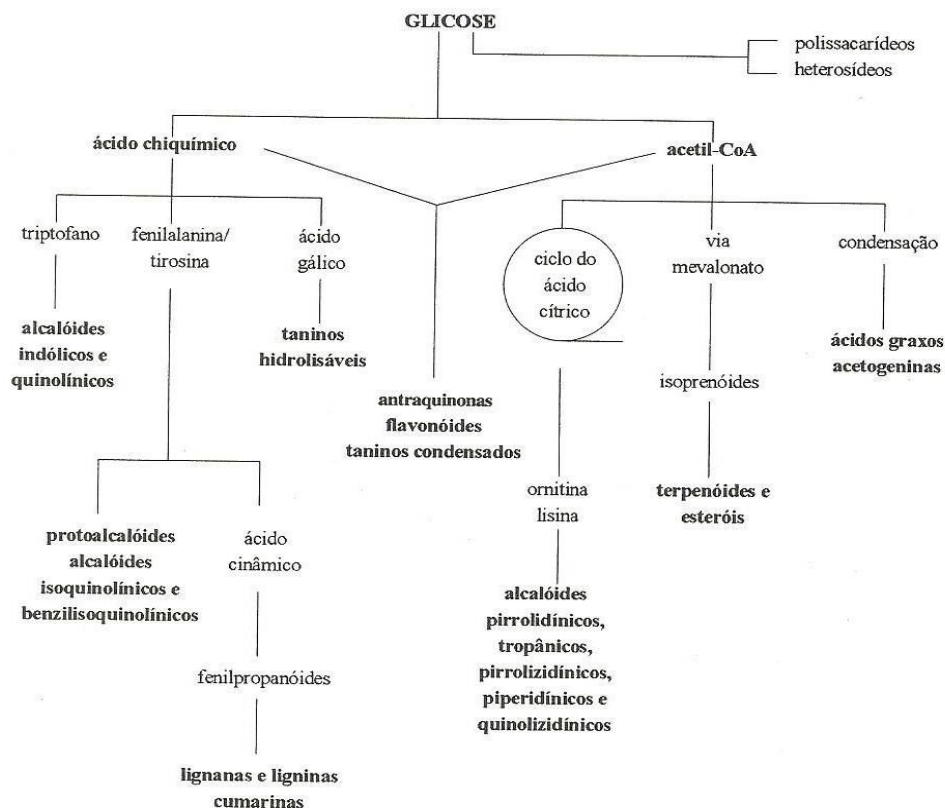


FIGURA 3: Esquema biossintético dos metabólitos secundários.

Fonte: Simões, 2007

Os terpenos representam a maior classe dos produtos naturais, havendo mais de 22.000 compostos terpenoides descritos. O mais simples terpenoide é o hidrocarboneto isopreno (C_5H_8). Não somente as plantas podem sintetizar os terpenoides, mas também os animais, bactérias, fungos e algas. Muitos compostos isoprenoides ocorrem em tecidos vegetais, porém muitos deles são encontrados como glicosídeos, éster de ácidos orgânicos e, em alguns casos, em combinação com proteínas. Esses compostos são classificados de acordo com o número de unidades de isoprenos (u.i) que constitui: monoterpenos (C_{10} , duas u.i), sesquiterpenos (C_{15} , três u.i), diterpenos (C_{20} , quatro u.i), sesterterpenos (C_{25} , cinco u.i), triterpenos (C_{30} , seis u.i), tetraprenos (C_{40} , oito u.i) (Figura 4) (BOWSHER et al., 2008).

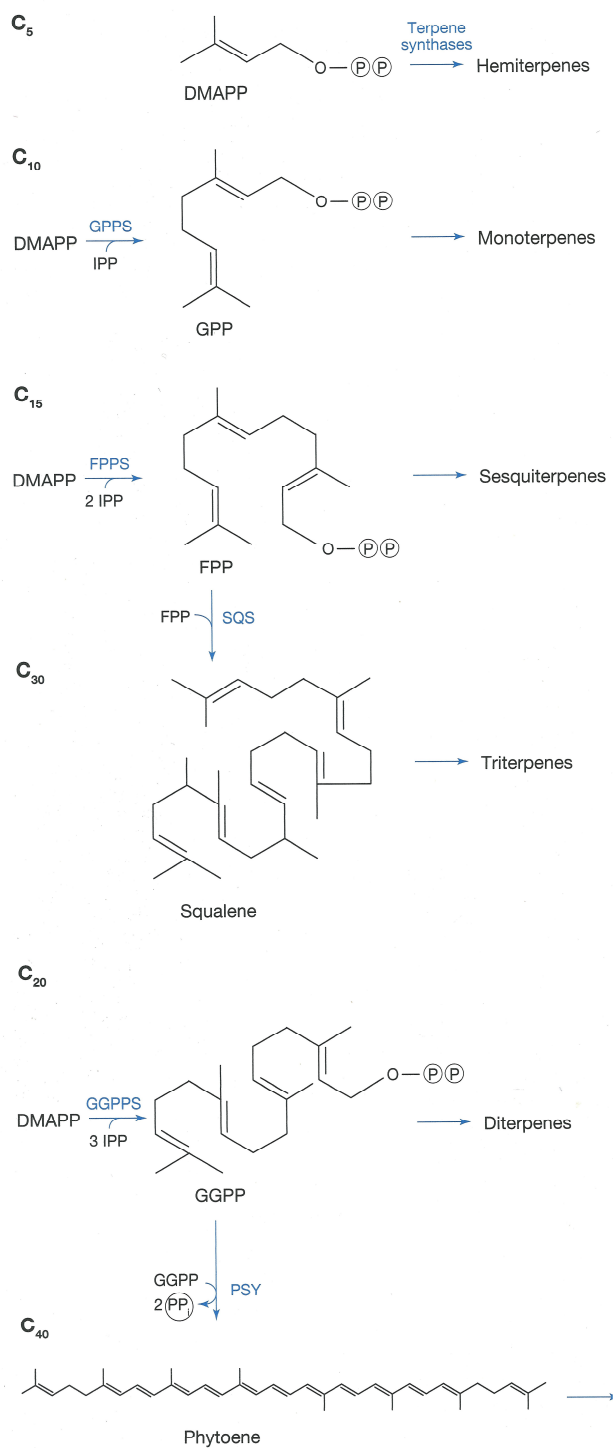


FIGURA 4: Formação das classes de terpenoides

Cerca de 90% dos óleos voláteis são compostos por monoterpenos, representando uma subclasse que compõem compostos como o citral, linalol, cânfora, terpinen-4-ol, carvacrol e outros. Quanto aos sesquiterpenos, são em geral menos voláteis que os monoterpenos, mas podem influenciar sensivelmente o odor dos óleos. A tujona, cânfora, fenchona, limoneno, mentol são alguns exemplos dos sesquiterpenos (MAIA, 2005).

Os óleos voláteis estão presentes nos órgãos das plantas em estruturas especializadas como os tricomas glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos, em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Figura 5). A depender da espécie vegetal podem estar presentes nas flores, folhas, menos frequentemente em raízes, rizomas, lenhas, cascas, frutos e sementes. As plantas ricas em óleos essenciais são comumente encontradas no grupo das Angiospermas dicotiledôneas, principalmente nas seguintes famílias: Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, Verbenaceae entre outras (SIMÕES et al., 2007).

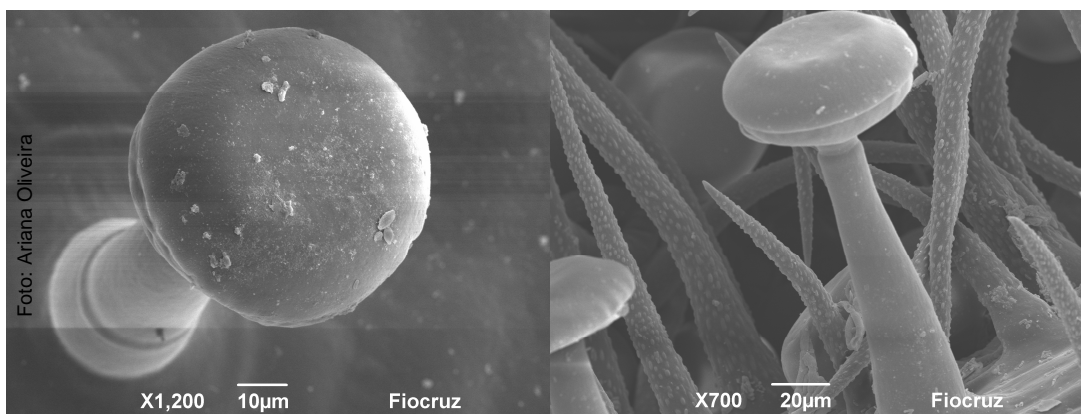


FIGURA 5: Tricoma glandular da *Lippia insignis*

Os constituintes do óleo essencial são complexos e variáveis, como os hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos de enxofre, dentre os quais se destacam os de baixo peso molecular, como os monoterpenos (10 carbonos) e sesquiterpenos (15 carbonos). A extração desses grupos de compostos pode ser feita por alguns processos

específicos, dentre eles, a enfloração ou *enfleurage*, atualmente restringe a algumas indústrias de perfumes; a prensagem ou expressão, utilizada na obtenção de óleo em frutos cítricos; extrações com o uso de solventes orgânicos e a extração por dióxido de carbono supercrítico, utilizado nas indústrias para que seja retirado todo solvente do produto final, tornando-o puro. Entretanto, o método mais utilizado para a obtenção de óleos essenciais é a destilação por arraste a vapor de água (SIMÕES et al., 2007). Os constituintes químicos do óleo são identificados por métodos de análise convencional, ou seja, a cromatografia em fase gasosa (CG), na maioria das vezes associada a espectrometria de massa (CG-MS)(HENNEBELLE et al., 2008).

Os compostos presentes nos óleos essenciais são importantes na elaboração de produtos naturais das indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos. Os aromas e as fragrâncias incorporadas nos alimentos, perfumes e produtos cosméticos possuem alto valor no mercado mundial. A indústria alimentícia a segunda maior consumidora desses óleos (BAKKALI et al, 2008). Recentemente, na agricultura e na pecuária, são desenvolvidas pesquisas sobre o uso de óleos essenciais como repelentes, antimicrobianos, inseticidas, para proteger as culturas de produtos agrícolas sintéticos (MATTOS, 2007).

Muitos componentes presentes nos óleos essenciais de várias espécies medicinais, a exemplo da *Mentha piperita* L., *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus*, *Citrus limonun*, *Lippia origanoides* entre outras, atribuem a essas plantas diferentes funções biológicas, tais como: regulação no crescimento, inseticidas, aleloquímicos, agente de atração, repelentes e feromônios (KNAAK e FIUZA, 2010).

A garantia e a determinação da ação biológica de um óleo essencial são limitadas, pois a sua composição é muito complexa e pode ser alterada por fatores relacionados às condições ambientais, tais como: pluviosidade, temperatura, umidade, sazonalidade, macro e micronutrientes do solo, entre outros (BIASI e DECHAMPS 2009).

Com isso, o interesse econômico relativo aos componentes aromáticos de plantas direciona-se à obtenção de espécies medicinais comercialmente cultivadas, considerando quantidade e qualidade das substâncias voláteis (PAVIANI, 2004).

5.1 Potencial bioativo do óleo essencial

5.2 Antioxidante

Os radicais livres são considerados um tipo de espécie reativa de oxigênio (ERO) produzida naturalmente ou por alguma disfunção biológica, caracterizados por apresentar moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados. A maior parte desses radicais é produzido nas mitocôndrias, onde a redução do oxigênio leva a formação das três principais espécies reativas do oxigênio: ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\text{HO}\bullet$) (WICKENS, 2001).

As EROs são importantes por estarem envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação de crescimento, sinalização celular e síntese de compostos biologicamente ativos. Contudo, quando a formação da espécie reativa de oxigênio excede a capacidade antioxidante de defesa da célula, dá-se origem ao estresse oxidativo, surgindo problemas associados à estas espécies radicalares, tais como danos na estrutura de proteínas, peroxidação lipídica nas membranas, alteração do DNA e inativação das enzimas (CARVALHO, 2004). Os efeitos danosos da produção de radicais livres em consequência ao estresse oxidativo pode ocasionar o envelhecimento e o surgimento de várias doenças patofisiológicas, incluindo diabetes, arteriosclerose coronária, mal de Alzheimer e de Parkinson, carcinogênese, doenças inflamatórias e imunológicas, como artrite, asma e alergia (RELIENE e SCHIESTL, 2006; FRANCO et al., 2008).

Os antioxidantes são compostos que diminuem a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais, podendo ser sintéticos ou naturais. As células humanas utilizam mecanismos enzimáticos como a catalase, a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase/reductase, e compostos como a vitamina C, vitamina E, cisteína, ácido úrico, β -caroteno e α -tocoferol, para manter níveis baixos de radicais livres e das espécies reativas de oxigênio (ERO) (MALINOWSKI, 2010).

Os antioxidantes artificiais, como o BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), TBHT (terc-butil hidroquinona), PG (propil galato) devido a suspeita de efeitos tóxicos, têm sido gradualmente restritos e associados com efeito negativo (SEMWAL et al., 1997). Este fato tem estimulado pesquisas por antioxidantes naturais que possam atuar isolados ou em sinergia com outros

aditivos, em substituição aos sintéticos. Com isso, os estudos voltados a avaliação da capacidade antioxidante tem aumentado, tanto em fármacos e cosméticos, quanto em alimentos e produtos naturais, uma vez que sabe-se da influência benéfica de muitos produtos naturais na saúde humana, associados ao decréscimo da atividade oxidante (HUANG et al., 2005).

Apesar de antioxidantes naturais como tocoferóis e ácido ascórbico serem largamente utilizados, a busca por novos compostos com atividade antioxidante extraído de plantas tem sido realizada (CARVALHO, 2004).

Estudos recentes têm comprovado a ação dos antioxidantes extraídos de plantas medicinais, principalmente pela presença dos compostos fenólicos, como os flavonoides e taninos. Esse grupo de metabólitos pode agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, ou mesmo na quelação de metais. Os óleos essenciais também possuem a capacidade de neutralizar radicais livres, devido à presença dos compostos fenólicos, carvacrol, eugenol e timol em sua composição química, devido à presença de um grupamento doador de elétrons na posição *orto* em relação à hidroxila fenólica (BOSCARDIN, 2009; GUIMARÃES; SOUZA, FERREIRA, 2010).

5.3 Antimicrobiano

A diversidade de substâncias ativas em espécies medicinais tem despertado o interesse pelo uso de extratos e óleos essenciais nos diversos segmentos industriais. Embora sua maior utilização ocorra nas áreas de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas), cosméticos (perfumes e produtos de higiene), indústria farmacêutica (DEBA et al., 2008; DIKBAS et al., 2008) e na agricultura, onde o uso dessas substâncias têm-se mostrado promissor.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos para avaliar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais no controle de doenças em plantas. Existem relatos da sua ação fungitóxica direta, ou indireta, por meio da indução do acúmulo de fitoalexinas, devido à presença de moléculas capazes de estimular qualquer resposta de defesa da planta (BONALDO, 2004; CARLOS et al., 2010). E por sua característica lipofílica (BAKKALI et al., 2008).

A descoberta de constituintes químicos com potentes atividades antifúngicas, embora ainda não inteiramente elucidadas, tem revelado ação inibitória sobre uma variedade de fitopatógenos, como *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp.; *Phytophthora cactorum*, *Cryphonectria parasítica*, *Fusarium circinatum*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Botrytis cinerea* (PEREIRA et al., 2006; LEE et al., 2008; SOUZA JUNIOR et al., 2009; SOYLU et al., 2010). Tais resultados contribuem para o desenvolvimento de novas substâncias naturais para ao uso na agricultura visando reduzir e/ou amenizar o uso de produtos químicos, haja vista que o uso intensivo de agrotóxicos acarreta uma série de problemas ambientais como a contaminação do solo e da água; resistência de fitopatógenos e eliminação de micro-organismos benéficos do solo (MOREIRA, 1996; PRITHIRAJ et al., 1997; STADNIK e TALAMINI, 2004; SCHWAN-ESTRADA e STANGARLIN, 2005).

Embora os fungicidas sintéticos sejam eficazes, a sua aplicação contínua pode ocasionar danos irreversíveis. O aumento da preocupação com os efeitos ambientais adversos tem motivado o desenvolvimento de métodos e produtos alternativos no controle de doenças de plantas. A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes em extratos brutos ou óleos essenciais de espécies medicinais pode tornar-se uma alternativa para uso na agricultura sustentável, visando o controle de fitopatógenos (ISMAN, 2000; BURT, 2004).

Considerando o potencial das espécies medicinais, este trabalho teve como objetivos: 1) avaliar a capacidade de produção de biomassa e óleo essencial; 2) avaliar composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial extraído de *Lippia origanoides* H. B. K.

Para cumprir esses objetivos desenvolveram-se os experimentos que serão descritos em três capítulos. O Capítulo I refere-se ao crescimento, acúmulo de minerais e produção de óleo essencial de *Lippia origanoides* em quatro épocas de colheita (janeiro, abril, julho e outubro) e tipo de adubação (orgânica e mineral). O Capítulo II trata-se da avaliação da composição química e atividade antioxidante do óleo de *Lippia origanoides* nas quatro épocas de colheita (janeiro, abril, julho e outubro) e tipos de adubação (orgânica e mineral), sendo os óleos selecionados para o experimento posterior (Capítulo 3), onde avaliou-se do efeito do óleo

essencial sobre o crescimento do *Aspergillus niger*, agente etiológico da prodridão vermelha no sisal.

REFERÊNCIAS

ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em: 17 julho 2009.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALMASSY JUNIOR, A.A. **Folhas de chá: plantas medicinais na terapêutica humana**. Viçosa: UFV, 2005, 233 p.

ALI, Z.; GANIE, S.H.; NARULA, A.; ABDIN, M.Z. SRIVASTAVA, P.S. Organic and inorganic fertilizers influence biomass production and esculin content in *Cichorium intybus* L. **Journal of Phytology**, v.4, n.5, p. 55-60, 2012.

ARAÚJO, J. C. L. V. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre micro-organismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2004.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BEDOYA, O.A. et al. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*H.B.K) del Alto Patia. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v.10, n.2, p. 79 – 86, 2012.

BEZERRA, A. M.E.; MEDEIROS FILHO, S.; OLIVEIRA, L.D.M.; SILVEIRA, E.R. Produção e composição da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.26-29, 2008.

BIASI, L. A.; MACHADO, E. M.; KOWALSKI, A. P. J.; SIGNOR, D.; ALVES, M. A.; LIMA, F. I. L.; DESCHAMPS, C.; CÔCCO, L. C.; SCHEER, A. P. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 35-39, 2009.

BIASI, L.A; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo a produção de óleo essencial**. Curitiba:Ltda, 2009,p. 160.

BLANK, A. F.; COSTA, A. G.; BLANK, M. F. A.;CAVALCANTE, S. C. H.; ALVES, P. B.; INNECCO, R.;EHLERT, P. A. D.; SOUZA, I. A. Influence of season,harvest

time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 557-564, 2007.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. TESSMAN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p.128-134, 2004.

BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage-Myrtaceae**. Curitiba, 2009. 139f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; FERRAZ, V.;BERTOLUCCI, S. K. V.; FIGUEIREDO, F. C. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* EpL. Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

BOWSHER, C.; STERR, M.; TOBIN, A. **Plant Biochemistry**. New York :Taylor e Francis group, 2008, 446p.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223–253, 2004.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**,v.33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 55, n. 3, p. 36-39, 2003.

CARDOSO, M.G.; SHAN, A.Y.K.V.; SOUZA, J.A. **Fitoquímica e Química de Produtos Naturais**. Lavras:Universidade Federal de Lavras, 2001. 67p.

CARLOS, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; ITAKO, A. T.; BONALDO, S. M.; MESQUINI, R. M.; CARVALHO, J. B.; STANGARLIN, J. R. Efeito de extrato bruto e óleo essencial de *Achillea millefolium* em desenvolvimento *in vitro* de *Corynespora cassicola* e proteção de pepino à mancha de corinespora. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.2, p.309-316, 2010.

CARVALHO, A.C.B., NUNES, D.S.G., BARATELLI, T.G., SHUQAIR, N.S.M.S.A. Q., Netto, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T e C Amazônia**, v.5, n.11, p.26-32, 2007.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Riberão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* L. (Mill) N. E. Br. em diferentes épocas de colheita e parte do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 2, p. 75-79, 2002.

CASTRO, H. G. de; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H. da; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais**: metabólitos secundários. 2. ed. Visconde do Rio Branco: UFV, 2004. 113 p.

CAVALCANTE, I.M.S.M. et al. Potencial Mutagênico (Teste de micronúcleos) e composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Lippia origanoides*. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza-CE, **Anais...**Fortaleza: Adaltech Soluções para eventos, 2009.

CHAVES, F.M.C.; MING, L.C.; CARVALHO, E.A.V.; FERNANDES, D.M.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.M. Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e teor de eugenol em alfavaca cravo, em função de adubação orgânica e sazonalidade. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, p.360, 2002.

CORAZZA, S. **Aromacologia**. São Paulo: SENAC, 2002. 414 p.

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade, **Química Nova**; v.21; n.1, 1998.

CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M.C. Fundamentos do cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. **Horticultura Brasileira**, v. 19, Suplemento, Palestras, p. 198, 2001.

COSTA, L.C.B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.956-959, 2005.

CUNHA, A.P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia**. Disponível em: [http:// www.antoniopcunha.com.sapo.pt](http://www.antoniopcunha.com.sapo.pt)>. Acesso em: 12 set. 2012.

CRAVEIRO, A.A.; QUEIROZ, D.C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**. v.16, n.3, p. 224-228, 1993.

DEBA, F.; XUAN, T. D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. **Food Control**, v. 19, p. 346-352, 2008.

DESCHAMPS, C.; ZANATTA, J. L.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, M. C.; ROSWALKA, L. C. Avaliação sazonal do rendimento de óleo essencial em espécies de mentas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 725-730, 2008.

DIKBAS, N.; KOTAN, R.; DADASOGLU, F.; SAHIN, F. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 179-182, 2008.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant physiology**, v.135, p.1893-1902, 2004.

ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F.; PIMENTA, F. C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 113-122, 2005.

FERREIRA, S.H. (org.) Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil, Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998, 142 p. Disponível em: <http://www.abc.org.br>. Acesso em 20 out. 2005.

FRANÇA, S.C. **Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4.ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade / UFRGS / UFSC., 2002. 833p.

FRANCO, R. et al. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 6-11, 2008.

GARCÍA-BARRIGA, H.G. **Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica**. Tomo II. 2ªed, Bogotá: Tercer Mundo, 1992, p.508. Disponível em: <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies>. Acesso em 20 out. 2012.

GILBERT, B.; FERREIRA, J.L.; ALVES, L.F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**. Curitiba: ABIFITO, 2005. 250p.

GIULIETTI, A.M.; CONCEICAO, A.; QUEIROZ, L.P. **Diversidade e caracterização das fanerogamas do Semiárido brasileiro**. Recife: Associação das Plantas do Nordeste, 2006. 488p.

GUIMARÃES, R.; SOUSA, M. J.; FERREIRA, I. F. F. R. Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p.152-156, 2010.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 211-222, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUSSAIN, A.I., ANWAR, F., SHERAZI, S.T.H., PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*)

essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, p. 986–995, 2008.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, 2012.

JÚNIOR, J.T. A.O.; QUEIROZ, S.R.O.D.; RIOS, A.P. Levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais do município de Itaberaba-BA para cultivo e preservação. **Sitientibus: Série Ciências Biológicas**, v. 5, n. 1, p. 39-44, 2005.

LEE, Y.; KIM, J.; SHIN, S.; LEE, S.; PARK, I. I. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour Fragrance Journal**, v. 23, p. 23-28, 2008.

LEITE, G.L.D.; SOUZA, M.F.; SOUZA JUNIOR, I.T.; FIGUEIREDO, L.S.; BONFIM, F.P.G.; MARTINS, E.R. Adubação orgânica afetando a ocorrência de pragas e a produção de Óleo essencial em *Lippia sidoides* Cham.(Verbenacea). **Revista brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.4, 2013.

LINDE, J. H. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essentials oils of *Lippia rehmanii* from South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 37-42, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2 ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008. p 544.

LUCHESE, A.M. et al. **Plantas da caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica**. Recife: Associação das plantas do Nordeste, IMSEAR (Instituto do Milênio do Semiárido), 2006. v.4. 297p.

KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos, **Neotropical Biology and Conservation**, v.5, n. 2, p.120-132,2010.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 676-680, 2005.

MAIA, S.S.S; PINTO, J.E.B.P; SILVA, F.N.; OLIVEIRA, C. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo do bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, n.4, p. 327-331 2008.

MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill. subespécie *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat., Myrtaceae**. Curitiba, 2010, 117f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1994.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998. 219 p.

MATOS, S.H.; INNECCO, R.; MARCO, C.A.; ARAÚJO, A.V. **Plantas Medicinais e Aromáticas Cultivadas no Ceará: Tecnologia de Produção e Óleos Essenciais**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007.110p.

MELO, J.I.M.; ALVES, I.M.; SOUSA, R.T.M.; BARBOSA, L.M.M.A.; ANDRADE, W.M. VERBENACEAE SENSU LATO EM UM TRECHO DA ESEC RASO DA CATARINA, BAHIA, BRASIL. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 41-47, 2010.

MENESES R, OCAZONEZ RE, MARTÍNEZ JR, STASHENKO EE. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, p.1-6, 2009.

MING, L.C. et al. **Manejo e cultivo de plantas medicinais: algumas reflexões sobre perspectivas e necessidades no Brasil**. In: COELHO, M.F.B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J.L.D. Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais: anais do I Seminário Mato-grossense de Etnobiologia e Etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Medicinais. Cuiabá: Unicen, 2003. p.149-156. MOREIRA, F. **Plantas que curam**. 5. ed. São Paulo: Hemus Editora Limitada, 1996.255p.

ISMAN, B.M. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection** , v.19, p.603–608., 2000.

OLIVEIRA, V.A., Lunkes, J.A., Argenta J.A., Oliveira, J.A., Dias D.R. Efeito da adubação mineral e orgânica sobre a produção de biomassa e óleo essencial de capim-limão. **Pro Homine**, v. 1, n. 1, p. 24-27, 2002.

OLIVEIRA, D.R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, 101, p. 236–240, 2007.

OLIVEIRA, A.L.S. **Avaliação sazonal da atividade antimicrobiana e da composição química de óleos essenciais de *Lippia thymoides***.2012.57f. Monografia (Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012

OMS – Organización Mundial de la Salud, Situación reglamentaria de los medicamentos herbarios. *Reseña Mundial*, 2000, 52 p.

PASCUAL, M.E. et al. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **IL Farmaco**, v. 56, p. 501–504, 2001

PASCUAL, M.E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201–214, 2001.

PAVIANI L.C. **Extração com CO₂ a altas pressões e fracionamento do óleo essencial de capim limão utilizando peneiras moleculares**. 2004, 92f. Dissertação (Mestrado)- Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.4, p. 731-738, 2006.

PIMENTEL, D.; HEPPELRY, P.; HANSON, J.; DOUDS, D.; SEIDEL, R. Environmental, Energetic, and Economic Comparisons of Organic and Conventional Farming Systems. **Bioscience**, v. 55, n.7, p. 573-582, 2005.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras:UFLA/Faepe, 2002, 169p.

PINTO, C. P. **Atividade antimicrobiana e perfil químico de espécies do gênero *Lippia* do Semi-árido da Bahia**. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.

PINTO, C.P. et al. Antimicrobial Activity of *Lippia* Species from the Brazilian Semiarid Region Traditionally Used as Antiseptic and Anti-Infective Agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, Article ID 614501, 5 pages, 2013.

PRITHIVIRAJ, B. et al. Antifungal activity of bergenin, a constituent of *Flueggea microcarpa*. **Plant Pathology**, London, v. 46, n. 2, p. 224-228, 1997.

RAMOS, S. J.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, C. C. L.; SILVA, D. D.; PALMEIRA, C. M.; MARTINS, E. R. Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 1, p. 9-12, 2005.

RELIENE, R.; SCHIESTL, R. F. Environmental Toxins, Nutrition, and Cancer. In: HEBER, D. et al. **Nutritional Oncology**. Burlington: Elsevier, 2006. p. 273-282.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 43-74.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

RODRIGUES, T.M. Nutrição mineral, crescimento e teor de óleo essencial da menta em solução nutritiva sob diferentes concentrações de fósforo e épocas de colheita. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p. 573-578, 2004.

ROJAS, J.; MORALES, A.; PASQUALE, S.; MARQUEZ, A.; RONDON, M.; IMRE, M.; Y VERES, K. Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia oreganoides* collected in two different seasons. **Natural Product Communications**, v.1, n.3, p.205-207, 2006.

SALIMENA, F. R. G. **Revisão Taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. 2000. 208 f. Tese (Doutorado em Ciências – Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SALIMENA, F.R.G., Thode, V., Mulgura, M., O'Leary, N. **Verbenaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB021449>. Acesso em: 05 jan. 2013

SANGWAN, N.S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, n.34, p.3-21, 2001.

SARRAZIN, S. L. F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1474-1478, 2012.

SEMWAL AD, SHARMA GK; ARYA SS. Antioxygenic activity of turmeric (*Curcuma longa*) in sunflower oil and ghee. **Journal of Food Science and Technology**, 34:67-69, 1997.

SILVA, P.A; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BARRETO, M.C.V. Efeito da adubação orgânica e mineral na produção de biomassa e óleo essencial do capim-limão [*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf] . **Revista Agrônômica**, v.34, p.92-96, 2003.

SILVA. M.C.; CARVALHO, J.C.T. Plantas Medicinais: In: J. C. T. Carvalho, Fitoterápicos. **Anti-inflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 2004, 480 p.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2007. p.467-496.

SOUZA, M. F. et al. Calagem e adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial em *Lippia citriodora* Kunth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.401-405, 2010.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009

SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3., p. 183-189, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p. 125- 138.

STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: UFSC, 2004. 293p.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; RUÍZ, C.A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal Separation Science**, v. 33, p.93-103, 2010.

VERBEL, J.O; CERVERA, J.G. FERNANDEZ, J.G.; COLORADO, B.J.;STASHENKO, E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n.4, v. 20, p. 565-574, 2010.

VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; ROMANEL, E. C.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G. Chromosome numbers in genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, p.171-178, 2006.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v.128, p. 379-391, 2001.

CAPÍTULO 1

CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K. EM FUNÇÃO DO TIPO DE ADUBAÇÃO E DA ÉPOCA DE COLHEITA

¹ Artigo ajustado e aceito pelo Comitê Editorial do periódico científico Industrial Crops and Products

CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K. EM FUNÇÃO DO TIPO DE ADUBAÇÃO E DA ÉPOCA DE COLHEITA

Autora: Simone Teles

Orientadora: Dra. Franceli da Silva

RESUMO: A *Lippia origanoides* H.B.K é uma espécie nativa do Brasil, possui propriedades medicinais para tratamento da gripe, bronquites, asma, tosse, distúrbios do trato digestório, e como antisséptico em geral, potencialmente capaz de ser inserida no mercado fitoterapêutico. Contudo, o fornecimento contínuo do material vegetal é necessário para sua inserção neste mercado, justificando-se estudos das variáveis que influenciam direta e indiretamente em sua produção. Para tanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adubação mineral e orgânica e das épocas de colheita sob o crescimento e rendimento do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. O experimento foi instalado no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana - Bahia, em agosto de 2011, utilizando-se o delineamento experimental em blocos casualizados no esquema de parcela subdividida no tempo, com quatro repetições. Na parcela foram avaliados dois tipos de adubos (orgânico e mineral) e o tratamento controle, sem adubação. A aplicação dos fertilizantes correspondeu ao equivalente a 80, 200 e 80 Kg ha⁻¹ (N, P₂O₅ e K₂O), e o adubo orgânico (10 toneladas ha⁻¹). Nas subparcelas foram avaliadas as épocas de colheita correspondente aos meses de janeiro, abril, julho e outubro. As extrações do óleo essencial das folhas de *Lippia origanoides* foram realizadas por hidrodestilação durante 3 horas, utilizando aparelho tipo Clevenger. Os resultados demonstraram que a adubação mineral favoreceu o aumento na produção da parte aérea da planta (folhas+inflorescência e caule) e em conjunto a produção total, na quarta época de colheita. Nas épocas de colheita, foi possível observar o aumento crescente da altura, diâmetro, matéria seca da folha+inflorescência e caule, não sendo expressiva a diferença entre os tratamentos com adubação até a terceira colheita. O teor de óleo foi maior nos meses de janeiro e abril. O rendimento de óleo essencial das folhas apresentou maiores médias de produção na quarta colheita com aplicação do adubo mineral. Conclui-se que houve influência da época de colheita sob o crescimento, teor e rendimento de óleo essencial e que as plantas submetidas à adubação mineral obtiveram maior produção de biomassa e óleo essencial.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, óleo essencial, análise de crescimento.

GROWTH, BIOMASS PRODUCTION AND ESSENTIAL OIL OF *LIPPIA ORIGANOIDES* H.B.K. ACCORDING TO THE FERTILIZATION TYPE AND HARVEST SEASON

Author: Simone Teles

Supervisor: Dra. Franceli da Silva

ABSTRACT: *Lippia origanoides* H.B.K. is a native species from Brazil, with medicinal properties for the flu treatment, bronchitis, asthma, cough, gastrointestinal disturbances, and as antiseptic in general, with a potential to be inserted in the phytotherapeutic market. However, the continuous supply of vegetal raw material is needed to its insertion in such market, being justifiable the study of the variables that influence directly or indirectly its production. For such, the present work had the objective to evaluate the effect of mineral and organic fertilization and the harvest season over the growth and essential oil yield of *Lippia origanoides* H.B.K. The experiment was installed in the Horto Florestal of the State University of Feira de Santana – Bahia, in August 2011, being used the experimental outline in randomized blocks in the scheme of parcels subdivided in time, with four repetitions. In each parcel were evaluated two types of fertilizers (organic and mineral) and a control treatment, without fertilization. The application of mineral fertilizer corresponded to the equivalent of 80, 200 and 80 kg ha⁻¹ (N, P₂O₅, and K₂O), and the organic fertilizer to 10 tons ha⁻¹. In the sub-parcels were evaluated the harvest seasons correspondent to January, April, July, and October. The essential oils extraction from leaves of *Lippia origanoides* were made by hydro-distillation in a Clevenger-type apparatus during 3 hours. The results showed that mineral fertilization favored the increase of production of the aerial part of the plant (leaves, inflorescence and stem) and in general the total production in the fourth harvest season. In the harvest seasons, it was possible to observe the continuous growth of plant height, diameter, dry material of flowers, inflorescences and stems, being not expressive the differences observed among fertilization treatments until the third harvest season. Essential oil content was higher in January and April. Essential oil yield of the leaves presented higher mean production values in the fourth harvest season with the application of mineral fertilizer. It was concluded that was influence of the harvest season over plant growth, oil yield and content and that plants submitted to mineral fertilization obtained higher biomass and essential oil production.

Keywords: *Lippia origanoides*; essential oil; growth analysis

INTRODUÇÃO

No Brasil, a região semiárida ocupa 11,5% do território nacional apresentando vasta riqueza de espécies vegetais (ASA BRASIL, 2010). Dentre as espécies encontradas nesta região, a *Lippia origanoides* H.B.K destaca-se devido a sua utilização no tratamento de gripes, bronquites, asma, tosse, distúrbios do sistema digestório e como antisséptico; além de ser utilizada como condimento e na estimulação do apetite (PASCUAL et al., 2001; AGRA et al., 2007). É uma espécie nativa do Brasil e ocorre nas diversas regiões do País, como no Norte (Pará, Amazonas), Nordeste (Bahia), Centro-oeste (Mato grosso, Goiás, Distrito Federal) e Sudeste (Minas Gerais, São Paulo) (SALIMENA et al., 2010), além de ser encontrada em outros países, como Colômbia, Venezuela e Guiana (PASCUAL et al., 2001). A espécie pertence à família Verbenaceae, sendo conhecida popularmente pelos nomes de salva-de-marajó, alecrim-d'angola e alecrim do tabuleiro. É uma planta rica em óleo essencial, composto responsável pelas propriedades terapêuticas, além de apresentar potencial para produção de cosméticos e condimentos (OLIVEIRA et al., 2007).

Contudo, a maioria das espécies medicinais nativas com finalidade terapêutica é obtida diretamente dos ecossistemas, o que tem levado a reduções drásticas das populações naturais (MYERS et al., 2000). Devido ao valor econômico agregado, o desenvolvimento de técnicas de cultivo para espécies medicinais, incluindo a *Lippia origanoides*, torna-se cada vez mais importante. Nesse contexto, as práticas agronômicas para obtenção de matéria-prima vegetal devem levar em consideração o aumento da produção de biomassa por área, sem comprometer o valor terapêutico da planta (BLANK et al., 2011). Para tanto, o fornecimento de nutrientes tem sido o principal aspecto para o aumento da produtividade das culturas (DUFALUT et al., 2003). Estudos feitos por Khalil et al. (2003); Tanu et al. (2004) Hussein et al. (2006) e Azizi et al. (2009) demonstraram efeitos positivos no incremento de biomassa quando fornecido ao solo adubos orgânicos e minerais. Os relatos na literatura ainda são escassos no que diz respeito à recomendação de fertilizantes para as espécies medicinais, pois a utilização destes podem ocasionar efeitos positivos ou negativos no material vegetal, podendo afetar a concentração do metabólito ativo de interesse.

Além dos fatores técnicos de cultivo, existem fatores externos, tais como temperatura, pluviosidade, altitude, latitude, vento, luminosidade (BOTREL et al., 2010), cuja variação ao longo do ano alteram o comportamento das plantas nos diferentes estádios de crescimento (BLANK et al., 2011). Por isso, o conhecimento da melhor época para a colheita poderá auxiliar na obtenção de um produto vegetal de melhor qualidade, tanto no aspecto fisiológico quanto no aspecto químico. Alguns resultados foram encontrados por diferentes autores relacionados à época de colheita, a exemplo da *Lippia sidoides* Cham. onde se verificou diferenças no incremento de matéria seca nas diferentes épocas de colheita (FIGUEREIDO et al., 2009). Em *Rosmarinus officinalis* L. o intervalo de coletas também aumentou o acúmulo de massa seca da parte aérea (MAY et al., 2010). Para *Mentha arvensis* L. esse efeito também foi observado (CHAGAS et al., 2011).

Em se tratando de sistemas de cultivo de plantas medicinais, a concentração dos princípios ativos presentes na biomassa vegetal é essencial. Isso porque a síntese desses compostos pode ser alterada conforme as condições ambientais e as técnicas de cultivo (MAIA et al., 2008). Portanto, os estudos agronômicos voltados para espécies medicinais nativas são urgentes e necessários, principalmente para as espécies com elevado potencial terapêutico. O desenvolvimento de sistemas de cultivo contribuirá para a obtenção de matéria-prima vegetal com qualidade, segurança e eficácia para comercialização, contribuindo para o desenvolvimento de uma cadeia produtiva. Para espécie *Lippia origanoides* ainda não existem recomendações e nem informações relacionada à exigência nutricional, por isso, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de dois tipos de adubação (orgânica e mineral) e da época de colheita (janeiro, abril, julho e outubro) sob o crescimento e rendimento de óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Produção de mudas e identificação da espécie

O experimento foi conduzido na Unidade Experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS, Bahia. Esta unidade situa-se a 234 metros de altitude, na latitude de 12°16'00" Sul e longitude de 38°58'00" Oeste, apresentando pluviosidade média de 750 mm por ano e temperatura variando em torno de 26°C. Segundo a classificação de Köppen, o clima local é do tipo BSh, semiárido quente.

As mudas de *Lippia organoides* H.B.K foram obtidas por estaquia da planta matriz da coleção de plantas aromáticas da referida unidade experimental. A espécie foi identificada pela taxonomista Tânia Regina dos Santos Silva (UEFS), com exsicata incorporada no Herbário da UEFS (HUEFS) com voucher número 83.373. No momento do plantio, as estacas tiveram dois centímetros de suas bases imersas em solução de ácido indolbutírico (AIB) na concentração de 250 mg L⁻¹ por 5 min. Decorrido esse tempo, as estacas foram colocadas em bandejas de poliestireno com 128 células, preenchidos pela mistura de vermiculita e substrato Biomix[®] na proporção 1:1. Quizenalmente, as mudas foram adubadas com Vitaplan, fertilizante misto (13-N;13-P₂O₅;15-K₂O) com micronutrientes. Após 41 dias, as mudas foram transferidas para copos descartáveis de 200 mL contendo composto orgânico produzido no local do experimento (Figura 1), onde permaneceram por mais 60 dias. Durante todo este período as mudas permaneceram em casa de vegetação com nebulização intermitente.



FIGURA 1. A - Casa de Vegetação do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS; B - Estacas de *Lippia origanoides* H.B.K. cultivadas em bandejas de poliestireno; C - Mudas de *Lippia origanoides* H.B.K. cultivadas em copos plásticos de 200mL . Feira de Santana-BA, UEFS, 2011.

2. Implantação do experimento e delineamento experimental

O ensaio foi instalado no campo em 10 de agosto de 2011, utilizando o delineamento experimental em blocos casualizados no esquema de parcela subdividida no tempo, com quatro repetições. Na parcela foram avaliados dois tipos de adubos (orgânico e mineral) e o tratamento controle, sem adubação. Nas subparcelas foram avaliadas as épocas de colheita, totalizando quatro coletas (janeiro, abril, julho e outubro). O experimento constitui-se de 48 parcelas e 6 plantas em cada área útil (Figura 2).

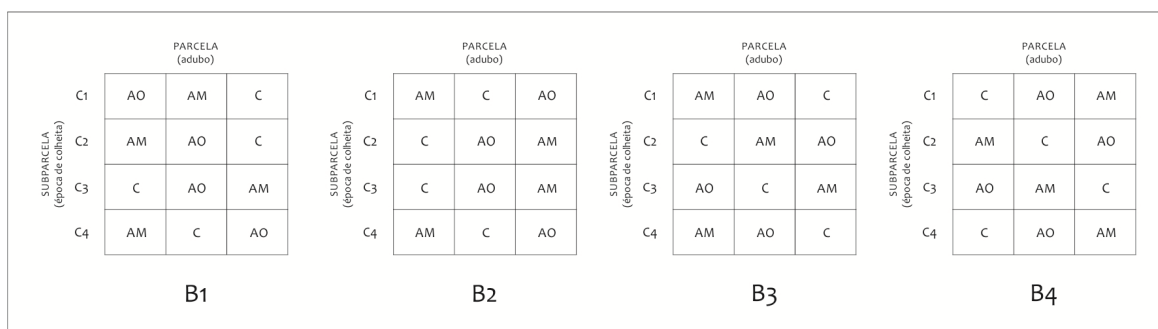


FIGURA 2. Esquema Experimental Feira de Santana-BA, UEFS, 2011.

Três meses antes do plantio procedeu-se a coleta de amostras para análise química do solo, realizada no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas-BA, segundo metodologia descrita no manual de análise do solo (EMBRAPA, 1979). O resultado da análise química encontra-se descrita na Tabela 1.

TABELA1. Resultado da análise química do solo da área experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana/BA.

| M.O | pH | P | K | Ca+Mg | Ca | Mg | Al | H+Al | Na | S | CTC | V |
|------|-------------------|---------------------|-----------------------|-------|-----|-----|-----|------|------|------|------|----|
| % | CaCl ₂ | mg dm ⁻³ | Cmol dm ⁻³ | | | | | | % | | | |
| 0,29 | 4,9 | 6 | 6 | 2,4 | 1,7 | 0,7 | 0,1 | 2,64 | 0,24 | 2,91 | 5,55 | 52 |

Para implantação das mudas na área experimental foi utilizado o espaçamento de 1,0 m entre linhas por 0,5 m entre plantas. As parcelas foram dispostas em filas duplas ocupando uma área útil de 6,0 m². O adubo mineral utilizado foi a formulação 10-10-10 (N, P₂O₅ e K₂O) e o superfosfato simples (Figura 3). Conforme a recomendação de Van Raij et al (1996) e baseado na análise do solo, utilizou-se 80, 200, 80 Kg ha⁻¹ (N, P₂O₅ e K₂O) via adubação mineral. Metade dos nutrientes foi aplicado no momento do plantio e a outra metade trinta dias após o plantio. Como fonte de adubação orgânica utilizou-se composto orgânico oriundo de resíduos vegetais produzido no local do experimento, na quantidade equivalente a 10 t ha⁻¹, aplicado na cova no momento do plantio (Figura 3). Como controle utilizou-se parcelas sem aplicação de

fertilizante químico ou orgânico. A análise química do composto orgânico descrita na Tabela 2 foi realizada no Departamento de Solos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-ESALQ, Piracicaba, São Paulo.



FIGURA 3. A – Aplicação do adubo orgânico na cova; B – Aplicação do adubo mineral na cova. C – Muda de *L. origanoides* em campo; D – Área experimental. Feira de Santana-BA, UEFS, 2011.

TABELA 2. Análise química do composto orgânico utilizado na área experimento do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana/BA.

| | |
|--|------|
| pH (CaCl ₂ 0,01M) | 6.8 |
| Densidade (g/cm ³) | 0.78 |
| Umidade total (%) | 26.7 |
| Relação C/N (carbono total e N total) | 11/1 |
| | % |
| Matéria orgânica total | 14.4 |
| Carbono total | 8.00 |
| Nitrogênio total | 0.73 |
| Fósforo (P ₂ O ₅) total | 0.19 |
| Potássio (K ₂ O) | 0.11 |
| Cálcio (Ca) total | 1.08 |
| Magnésio (Mg) total | 5.55 |
| Enxofre (S) total | 0.08 |

Durante todo período de cultivo, foram realizadas capinas manuais em número suficiente para o controle das plantas espontâneas. Inicialmente a irrigação foi manual, duas vezes ao dia, até o pegamento das mudas em campo. Após seu estabelecimento, adotou-se o sistema de irrigação por aspersão para manutenção da umidade do solo.

3. Colheita e análise de crescimento

Aos 150 dias de cultivo no campo, janeiro/2012, realizou-se a primeira colheita, entre 8 e 9 horas da manhã, cortando-se a parte aérea das plantas 5 cm acima do solo (Figura 4). Ao longo do experimento foram realizadas quatro colheitas, com intervalos regulares de 90 dias contados a partir da primeira coleta, correspondentes aos meses de janeiro, abril, julho e outubro. Foram amostradas quatro plantas por parcela e as medidas para análise do crescimento foram realizadas no momento da colheita.

Para cálculo dos parâmetros de crescimento foi obtida inicialmente a altura das plantas, dada pela distância entre o nível do solo e a extremidade superior da planta; o diâmetro da base do caule foi mensurado com auxílio de paquímetro. A obtenção da massa da matéria seca, cada órgão (folha+inflorescência e caule) foi pesado, separado em sacos de papel e levados à estufa com circulação forçada de ar a 40° C para as folhas+inflorescência e 60°C para os caules, até peso constante (Figura 4). Esses mesmos parâmetros foram obtidos de cinco plantas não tratadas, no dia da sementeira, sendo este considerado o tempo zero. A partir das variáveis quantificadas foram calculados a taxa de crescimento relativo (TCR) em relação à massa da matéria seca total, altura e diâmetro do caule, segundo metodologia descrita por Cairo et al. (2008), cujas fórmulas encontram-se abaixo (Equação 1):

$$TCR = \frac{(\ln M2 - \ln M1)}{(t2 - t1)} = (g g^{-1} dia^{-1})$$

$$TCR = \frac{(\ln D2 - \ln D1)}{(t2 - t1)} = (mm mm^{-1} dia^{-1})$$

$$TCR = \frac{(\ln A2 - \ln A1)}{(t2 - t1)} = (cm cm^{-1} dia^{-1})$$

onde:

M1 e M2 = matéria seca total; D1 e D2= diâmetro; A1 e A2 = altura

t2 e t1= tempo

ln = logaritmo neperiano

$g\ g^{-1}\ dia^{-1}$ = referente ao ganho de matéria seca em gramas por dia;

$mm\ mm^{-1}\ dia^{-1}$ = referente ao crescimento do diâmetro em milímetro por dia

$cm\ cm^{-1}\ dia^{-1}$ = referente ao aumento da altura da planta em centímetro por dia

EQUAÇÃO 1: Cálculo da TCR da matéria seca total, diâmetro e altura.



FIGURA 4. A – *Lippia origanoides*, mês de abril; B – Colheita manual; C- Separação das Folhas+Inflorescência e caule; D- Secagem em estufa com circulação forçada de ar. Feira de Santana-BA, UEFS, 2012.

4. Análise dos Nutrientes da Folha+Inflorescência

Para quantificação do teor de nutrientes, 4 amostras contendo 5 gramas de folhas+inflorescências foram obtidas em cada época de colheita para cada tratamento. O material vegetal foi seco, moído e armazenado até o momento da análise.

Os nutrientes foram determinados no Laboratório de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-SP, de acordo com metodologia descrita por Malavolta et al. (1997).

5. Extração do Óleo Essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação no Laboratório de produtos naturais (LAPRON) do Departamento de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS.

Parte do material seco foi separado para determinação do teor de umidade. O procedimento foi realizado em triplicata no determinador de umidade (Série ID Versão 1.8 Marte®.); onde cada repetição continha 1g do material. As amostras foram secas a temperatura de 100°C, até que não houvesse variação na pesagem de 0,1% em 30 s.

Para extração do óleo essencial amostras de 100g de folhas+ inflorescência previamente secas e trituradas rapidamente no liquidificador industrial foram adicionadas em balão de vidro de 5 litros contendo água destilada em volume suficiente para cobertura total do material vegetal, iniciando o processo de hidrodestilação. Foram adotados aparatos do tipo Clevenger graduados, acoplados em balões de vidro, que foram aquecidos por mantas térmicas elétricas com termostato (Figura 5). O processo de extração foi conduzido durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota, sendo verificado o volume de óleo extraído na coluna graduada do aparelho de Clevenger. Com objetivo de remover a água residual foi adicionado ao óleo essencial sulfato de sódio anidro para evitar perdas por hidrólise durante o armazenamento. Posteriormente, com o uso de pipeta do tipo Pasteur, o óleo foi acondicionado em frasco de vidro de 2

mL envolto em papel alumínio, etiquetado e armazenado em congelador comercial a -5 °C ao abrigo da luz até a realização da análise química.

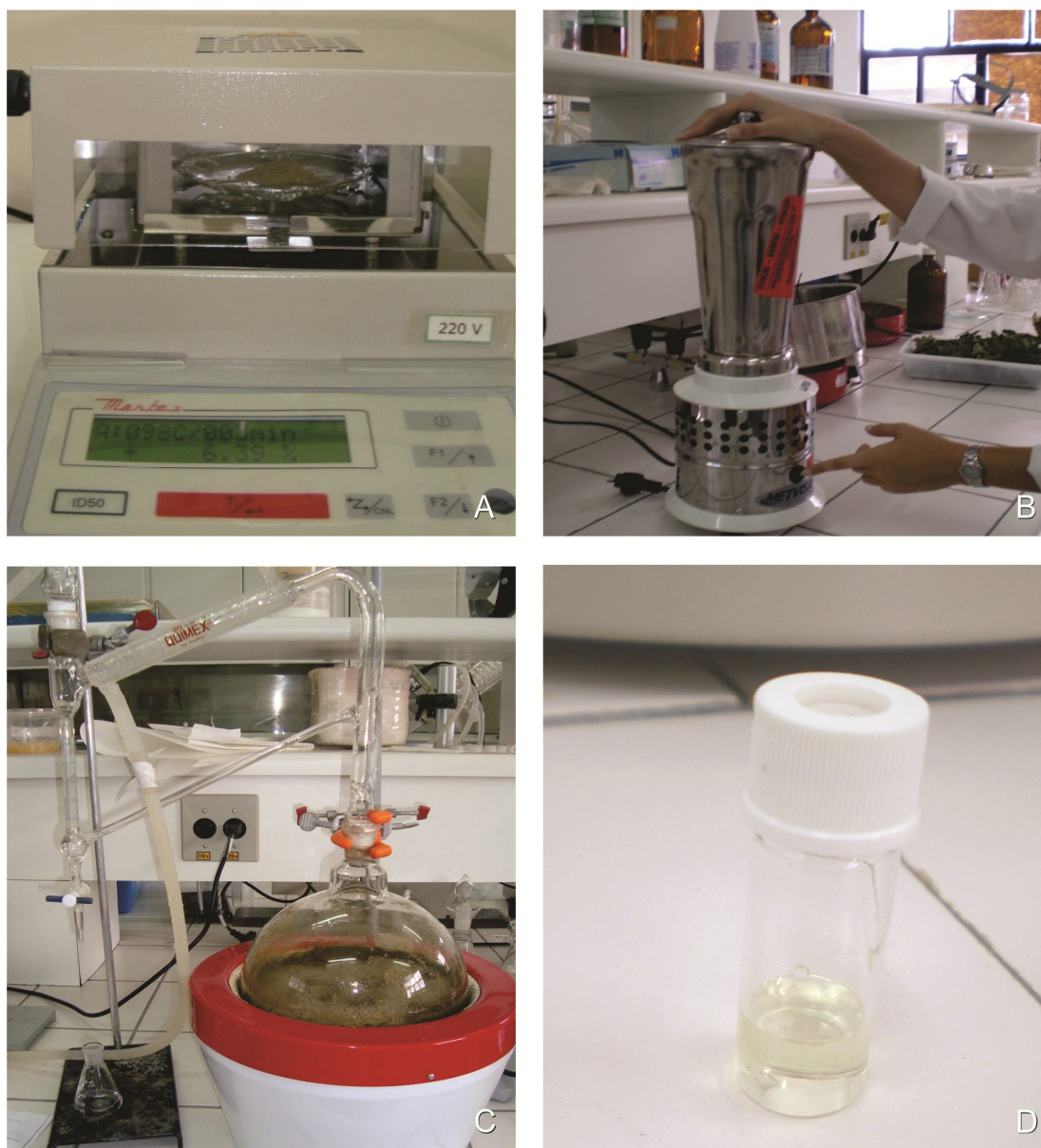


FIGURA 5. A – Determinador de umidade; B – Trituração das folhas+inflorescência de *L. origanoides* H.B.K; C- Hidrodestilação em aparato tipo Clevenger; D- Óleo essencial obtido após 3 horas de destilação. Feira de Santana-BA, UEFS, 2012.

O teor do óleo essencial foi calculado a partir da base livre de umidade (BLU), que corresponde ao volume (mL) de óleo essencial em relação à massa seca da amostra, conforme metodologia proposta por Santos et al. (2004) (Equação 2).

$$To = \frac{Vo}{Bm - \frac{(Bm \times U)}{100}} \times 100$$

Onde:

To = Teor de óleo (%)

Vo= Volume de óleo extraído

Bm= Biomassa aérea vegetal

(BmxU)= Quantidade de umidade presente na biomassa

EQUAÇÃO 2: Cálculo do teor de óleos essenciais.

Para o cálculo do rendimento de óleo por hectare multiplicou-se a produção da biomassa das folhas e inflorescências pelo teor de óleo essencial

6. Variáveis climáticas

Durante o experimento foram coletados mensalmente no site do Instituto Nacional de Meteorologia-INMET os valores médios das variáveis climáticas: temperatura (°C), precipitação pluvial (mm) e umidade relativa (%). Os dados destas variáveis encontram-se dispostos na Tabela 3.

TABELA 3. Variáveis meteorológicas registradas durante o experimento. Feira de Santana, 2011.

| Mês | Ano | Temperatura | Umidade | Precipitação |
|------|------|-------------|---------|--------------|
| | | °C | % | mm |
| Ago. | 2011 | 22,19 | 76,14 | 33 |
| Set. | 2011 | 23,03 | 70,92 | 21 |
| Out. | 2011 | 25,12 | 72,10 | 143 |
| Nov. | 2011 | 24,56 | 75,90 | 90 |
| Dez. | 2011 | 25,33 | 76,35 | 53 |
| Jan. | 2012 | 26,31 | 67,38 | 22 |
| Fev. | 2012 | 25,72 | 70,98 | 15 |
| Mar. | 2012 | 26,12 | 67,91 | 5 |
| Abr. | 2012 | 26,09 | 68,48 | 21 |
| Mai. | 2012 | 24,85 | 78,87 | 61 |
| Jun. | 2012 | 23,61 | 77,55 | 69 |
| Jul. | 2012 | 22,65 | 78,52 | 19 |
| Ago. | 2012 | 23,23 | 71,76 | 5 |
| Set. | 2012 | 25,32 | 63,34 | 24 |
| Out. | 2012 | 24,10 | 71,86 | 31 |

7. Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 3 tratamentos (adubação orgânica, adubação mineral e o controle) e quatro repetições, no esquema de parcela subdividida no tempo, representado pelos períodos de colheita (janeiro, abril, julho e outubro). A análise dos dados foi realizada, utilizando-se o Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000). As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância pelo teste de F e aplicado o teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Análise de Variância

A análise de variância para os parâmetros de crescimento e produção estão apresentadas na Tabela 4. Foram avaliados os efeitos isolados da adubação e época de colheita e a interação entres os dois fatores. Verificou-se que para todas as variáveis avaliadas não houve efeito isolado da adubação segundo o teste de F ($p > 0,05$). Já para altura das plantas, diâmetro do caule, taxa de crescimento da altura, diâmetro, peso total e teor de óleo essencial houve influência apenas para época de colheita ($p < 0,05$). Entretanto, a análise de variância para peso seco da folha+inflorescência, do caule e total e rendimento do óleo essencial indicou interação significativa entre a época de colheita e adubação ($p < 0,05$).

TABELA 4. Análise de Variância da média das características de crescimento de *Lippia origanoides* H.B.K em função da época de colheita, tipo de adubação e interação dos fatores. Feira de Santana, 2012.

| Variáveis | Fatores | Grau de Liberdade | Valor-F | Significância | P |
|--|---------------|-------------------|---------|---------------|----|
| Altura da planta (cm) | Adubação (AD) | 2 | 0,172 | 0,845 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 89,072 | 0,000 | ** |
| | ADXEP | 6 | 1,483 | 0,239 | ns |
| Diâmetro do caule (mm) | Adubação (AD) | 2 | 2,864 | 0,133 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 12,893 | 0,001 | ** |
| | ADXEP | 6 | 0,660 | 0,625 | ns |
| Peso seco do caule (g/04plantas) | Adubação (AD) | 2 | 5,789 | 0,039 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 55,038 | 0,000 | ** |
| | ADXEP | 6 | 11,171 | 0,000 | ** |
| Peso seco da folha+inflorescência (g/04 plantas) | Adubação (AD) | 2 | 1,911 | 0,227 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 97,098 | 0,000 | ** |
| | ADXEP | 6 | 4,394 | 0,006 | ** |
| Peso seco total (g/04plantas) | Adubação (AD) | 2 | 4,544 | 0,062 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 74,632 | 0,000 | ** |
| | ADXEP | 6 | 9,225 | 0,000 | ** |
| Peso seco total (Kg ha ⁻¹) | Adubação (AD) | 2 | 3,680 | 0,090 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 40,249 | 0,000 | ** |
| | ADXEP | 6 | 10,594 | 0,000 | ** |

Continuação da Tabela 4

| | | | | | |
|---|---------------|---|------------|-------|----|
| Taxa de crescimento relativo da altura | Adubação (AD) | 2 | 1,000 | 0,421 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 81,000 | 0,000 | ** |
| | ADXEP | 6 | 1,000 | 0,455 | ns |
| Taxa de crescimento relativo do diâmetro do caule | Adubação (AD) | 2 | 1,564 | 0,245 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 141,05 | 0,000 | ** |
| | ADXEP | 6 | 8 0,454 | 0,837 | ns |
| Taxa de crescimento relativo do peso total | Adubação (AD) | 2 | 0,429 | 0,669 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 110,26 | 0,000 | ** |
| | ADXEP | 6 | 8 1,235 | 0,334 | ns |
| Teor de óleo essencial (%) | Adubação (AD) | 2 | 5,771 | 0,040 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 54,900 | 0,000 | ** |
| | ADXEP | 6 | 0,503 | 0,798 | ns |
| Rendimento de óleo essencial (Kg.ha ⁻¹) | Adubação (AD) | 2 | 4,012 | 0,078 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 83,791 | 0,000 | ** |
| | ADXEP | 6 | 3,374 | 0,020 | ** |

ns = não significativo (P<0,05); ** significativo a 5% probabilidade

2. Crescimento e produção de óleo essencial

Verificou-se que as médias de altura da planta e diâmetro do caule foram incrementadas à medida que aumentou o tempo da época da colheita (Tabela 5). Para altura, houve um acréscimo médio de 49,61% entre o período de Janeiro à Outubro e 32,14% no mesmo período para diâmetro do caule. Estes resultados podem ser atribuídos aos processos metabólicos ocorridos nos diferentes estágios de desenvolvimento da espécie, sendo a fase inicial caracterizada pela maior taxa de crescimento relativo, aumentando de maneira linear com o tempo através da deposição de fotoassimilados e expansão das células (TAIZ e ZEIGER, 2009). May et al. (2010) observaram efeitos semelhantes com o crescimento de plantas de *Rosmarinus officinalis* L., em função do intervalos de cortes, onde houve aumento linear a medida que aumentou o período da coleta.

TABELA 5. Médias do crescimento e produção de óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K em função da época de colheita e tipos de adubação. Feira de Santana-BA, 2012.

| Variáveis | Adubação | Época de colheita | | | |
|---|-------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | Janeiro | Abril | Julho | Outubro |
| Altura da Planta (cm) | Controle | 92,17 Ac | 99,41 Ac | 161,59 Ab | 198,27 Aa |
| | Adubação orgânica | 105,87 Ac | 110,59 Ac | 146,53 Ab | 192,18 Aa |
| | Adubação mineral | 99,71 Ac | 107,69 Ac | 152,99 Ab | 200,47 Aa |
| Diâmetro do caule (mm) | Controle | 0,96 Ab | 1,05 Ab | 1,21 Aab | 1,40 Aa |
| | Adubação orgânica | 0,97 Ab | 1,33 Aa | 1,40 Aa | 1,42 Aa |
| | Adubação mineral | 0,93 Ab | 1,08 Aab | 1,21 Aab | 1,39 Aa |
| Peso seco do caule (g/04 plantas) | Controle | 69,38 Ac | 75,00 Ac | 343,43 Aa | 223,44 Bb |
| | Adubação orgânica | 69,44 Ab | 77,27 Ab | 226,92 Ba | 162,20 Bb |
| | Adubação mineral | 69,94 Ac | 86,62 Ac | 193,92 Bb | 357,36 Aa |
| Peso seco da folha +inflorescência (g/04 plantas) | Controle | 50,79 Ab | 33,35 Ab | 154,84 Aa | 151,99 Ba |
| | Adubação orgânica | 48,89 Ac | 46,94 Ac | 172,96 Aa | 124,86 Bb |
| | Adubação mineral | 43,19 Ab | 46,67 Ab | 165,77 Aa | 197,25 Aa |
| Peso seco total (g/04 plantas) | Controle | 120,18 Ac | 108,34 Ac | 498,27 Aa | 375,43 Bb |
| | Adubação orgânica | 118,33 Ac | 124,21 Ac | 399,88 Ba | 287,05 Bb |
| | Adubação mineral | 113,14 Ac | 133,29 Ac | 359,69 Bb | 554,61 Aa |
| Teor de óleo essencial (%) | Controle | 4,38 Aa | 4,62 Aa | 3,23 Ab | 3,55 Ab |
| | Adubação orgânica | 4,43 Aab | 5,00 Aa | 3,23 Ac | 3,88 Abc |
| | Adubação mineral | 4,35 Aab | 5,00 Aa | 3,43 Ac | 4,02 Abc |
| Rendimento de óleo essencial (kg.ha ⁻¹) | Controle | 44,45 Ab | 30,84 Ab | 99,61 Aa | 107,65 Ba |
| | Adubação orgânica | 43,47 Ab | 46,36 Ab | 111,80 Aa | 97,86 Ba |
| | Adubação mineral | 37,41 Ac | 46,42 Ac | 113,45 Ab | 158,74 Aa |

Médias seguidas da mesma letra na coluna (maiúscula) e na linha (minúscula) não difere significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey .

Em relação às demais características de crescimento, peso seco da folha+inflorescência, peso seco do caule, peso seco total e rendimento de óleo essencial observou-se a interação dos fatores, onde a adubação combinado com a época de colheita influenciaram a produção da planta (Tabela 5). Os resultados obtidos para o peso seco do caule indicam que houve um aumento progressivo até a terceira colheita (julho) para os tratamentos com adubação orgânica e o controle, havendo uma redução de 28,52% e 35%, respectivamente, entre as colheitas realizadas no mês de julho e outubro. Já o tratamento com adubação mineral, o ganho de matéria seca do caule foi linear ao longo do período, correspondendo a 69,94 g em janeiro e 357,36g no mês de outubro. As plantas colhidas nos meses de janeiro e abril apresentaram menores valores médios do peso seco do caule, alcançando melhores médias nos meses de julho e outubro.

O efeito da adubação orgânica e química não foi superior ao controle na terceira colheita, contudo, a adubação com fertilizante químico influenciou positivamente o ganho da matéria seca do caule na quarta colheita. Entretanto, não houve diferença significativa entre o controle e adubação orgânica. Concernente ao efeito da época de colheita sob o peso seco do caule verifica-se no tratamento controle a queda do peso no último estágio de avaliação e o aumento contínuo nas plantas adubadas.

As respostas positivas no crescimento da *Lippia origanoides* à adubação mineral e orgânica são justificadas e, também, sugerem que esta espécie, com o tempo torna-se exigente em termos nutricionais, o que favoreceu os processos metabólicos e estimulou um maior acúmulo de matéria seca. Observou-se também que somente nos meses de julho e outubro foram identificados diferenças entre os tratamentos com adubação, provavelmente devido à maior estabilidade da planta em campo e maior capacidade de absorção dos nutrientes disponíveis no solo, sendo este o período provável de maior exigência nutricional da espécie.

Assim como o peso do caule, o peso seco da folha+inflorescência demonstrou valores médios superiores nos últimos meses de colheita (164,52g e 158,03g), sendo as primeiras colheitas (janeiro e abril) caracterizadas por menores quantidades de matéria seca foliar (47,62g e 42,32g), respectivamente. No mês de outubro verificou-se um decréscimo de 28% no tratamento com adubo orgânico, no entanto, para os demais tratamentos essa diferença não foi

observada, ou seja, não houve diferença significativa entre os meses de maiores ganhos de biomassa (julho e outubro).

A redução da produção de folhas na quarta colheita com a aplicação do adubo orgânico pode ser explicada devido à relação existente entre a eficiência do adubo orgânico com a sua composição química, taxa de mineralização e teor de nitrogênio, os quais também são influenciados pelas condições climáticas (KIEHL, 1985). Apesar de alguns estudos revelarem que a adição da matéria orgânica traz melhoria as propriedades do solo, como agregação, capacidade de retenção de água, condutividade hidráulica, densidade e fertilidade (EWULO, 2005), afetando positivamente o crescimento e desenvolvimento das plantas, o composto orgânico produzido e utilizado no experimento não apresentou características favoráveis ao atendimento da exigência nutricional da espécie. Os níveis de nitrogênio, fósforo e potássio, nutrientes positivamente correlacionados à produtividade da planta, estavam em baixas quantidades no adubo, afetando seu acúmulo na folha, conseqüentemente reduzindo a fitomassa foliar. Portanto, o fertilizante químico proporcionou maior acúmulo de fitomassa foliar no mesmo período. Resultados encontrados por Prabhakar et al. (2011) em *Artemisia annua* L. revelaram ganhos significativos para biomassa foliar nas duas fontes de adubos utilizadas, química e orgânica.

Somente nas plantas colhidas em outubro constatou-se efeito positivo do adubo químico sobre a matéria seca da folha+inflorescência (197,25g), diferindo dos demais tratamentos que obtiveram valores médios inferiores, o adubo orgânico (124,86g) e o controle (152g).

Considerando-se a biomassa total da planta, verificou-se um aumento da produção até a terceira colheita nos tratamentos com adubação orgânica e o controle. Para a adubação mineral o aumento foi crescente, constando um comportamento linear até a última colheita. Nos meses de janeiro e abril, verificaram-se menores produções. Já os maiores ganhos de biomassa da parte área foram observados nos meses de julho e outubro. De certa forma, a situação observada era esperada, já que as épocas de colheitas representam plantas com idades diferentes (janeiro- 05 meses, abril-08 meses, julho-11 meses, outubro- 14 meses), com isso, é possível verificar uma maior produção de biomassa da parte área à medida que as plantas se desenvolvem. Segundo Santos Júnior et al. (2004), a capacidade fotossintética reduz com a idade mais avançada da planta o

que reflete no aumento da produção em relação a massa total da planta e representa o maior custo de respiração e de redistribuição de fotoassimilados para o crescimento vegetal. Contudo, no tratamento controle verificou-se uma perda de 24,65% e para adubação orgânica 28,21% entre os meses de julho e outubro. Estudos realizados por YANG et al. (2013) em plantas de *Stevia rebaudiana* submetidas a adubação orgânica e mineral em cinco período de cortes, os autores obtiveram maiores produções de biomassa nas colheitas mais tardias e com adubação orgânica. Souza et al. (2010) obtiveram acréscimo na produção de folhas e ramos de *Lippia citridora* Kunt na segunda época após 120 dias da primeira.

Com referência aos adubos, só foram verificadas influência na última colheita, ou seja, no 14^o mês de cultivo das plantas. O adubo químico promoveu médias superiores de biomassa em relação ao controle e adubação orgânica, atingindo uma produção de 48% e 93% a mais que os demais tratamentos, respectivamente. Neste aspecto, entende-se que a forma prontamente disponível dos nutrientes na adubação mineral (KIEHL, 2008), juntamente com a maior disponibilidade de P_2O_4 proporcionada pela maior adição deste no fertilizante químico, pode ter sido a responsável em estimular a maior produção do peso seco total no mês de outubro. Hussein et al. (2006), atribuem o desempenho do crescimento da planta à disponibilidade dos macronutrientes disponibilizados pelo adubo, estimulando os processos metabólitos nas diferentes espécies. Alguns autores verificaram que a aplicação de fertilizante promoveu efeitos significativos sobre o crescimento das espécies, a exemplo de Rahimi e Kamali (2012), Ahmed et al. (2011), Rosal et al. (2009), Tanu et al. (2004), Alvarez-Castellanos e Pascual-Villalobos (2003) trabalhando com *Silybum marianum* (L.) Gaertn), *Hibiscus sabdariffa* L., *Plectranthus neochilus* Schlechter, *Cymbopogon winterianus* e *Chrysanthemum coronarium*, respectivamente. No mês de julho, 11^o mês de cultivo, verificou-se a maior produção total de *Lippia origanoides* nas plantas que não foram adubadas, principalmente devido à produção de caules, vindo em seguida com a menor contribuição das folhas+inflorescências.

O desempenho das espécies medicinais não depende exclusivamente das condições de cultivo e nem sempre o uso de adubo pode ocasionar o incremento desejado para a planta. No trabalho de Costa et al. (2008) com [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.] avaliando o efeito da adubação mineral e de composto

orgânico não observaram diferenças estatística entre os tratamentos para biomassa seca da parte aérea. Assim, a resposta diferenciada de cada espécie pode ser explicada pela variação na quantidade e fonte de adubo utilizada, sendo que para as espécies medicinais ainda são incipientes os estudos voltados para demanda nutricional. Contudo, o conhecimento das necessidades nutricionais para essas espécies passa a ser imprescindível para boas produções e manutenção da qualidade do plantio.

Analisando os resultados de teor de óleo essencial verifica-se que os meses de Janeiro e Abril apresentaram melhores médias em relação ao teor de óleo essencial (4,6%) (Tabela 5). Em se tratando das espécies medicinais a produção de matéria seca da planta deve estar proporcionalmente relacionada à síntese do(s) metabólito(s) de interesse, no caso de *Lippia origanoides* o óleo essencial. No presente estudo, o aumento da matéria seca foliar ao longo do período reduziu o teor de óleo essencial, provavelmente pelo efeito de diluição do óleo em função do aumento de biomassa. Azizi et al. (2009) avaliando o efeito de fertilizante nitrogenado em *Origanum vulgare* L observou o aumento da produção de matéria seca e redução no teor de óleo essencial.

Os dados também demonstram que houve uma correlação positiva entre a temperatura e o teor de óleo essencial e negativo em relação à umidade. Ou seja, à medida que aumentou a temperatura e reduziu a umidade houve um aumento na síntese do óleo essencial (Tabela 6). Por outro lado, para o fator precipitação não se detectou correlação dos dados.

TABELA 6 Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os fatores climáticos e o teor de óleo essencial (TO).

| | n | Temperatura | Umidade | Precipitação |
|----|----|-------------|----------|-----------------------|
| TO | 48 | 0,822** | -0,785** | -0,0715 ^{ns} |

n = número de amostra; ns = não significativo (P<0,05); ** significativo a 5% probabilidade

Apesar das diferenças pouco expressivas de temperatura entre os meses de colheita, observou-se durante o experimento que os meses de Janeiro e Abril foram mais quentes do que os meses de julho e outubro (Tabela 3). De acordo com Gazim et al. (2010), durante o desenvolvimento da planta a geração de

metabólitos secundários pode ser afetada pela radiação, temperatura, umidade, vento, altitude, solo, época da colheita, e outros fatores. Hussain et al. (2008) demonstraram que a temperatura influenciou a quantidade de óleo de *Ocimum basilicum*, com maiores produtividades observadas no inverno (0,27%) e menores na primavera (0,17%). Resultados similares foram encontrados por Wang et al. (2012) em *Schefflera heptaphylla* (L.), onde os maiores teores de óleo foram encontrados também nas plantas colhidas no inverno (0,27%). Já Nogueira et al. (2007) constataram melhores rendimentos do óleo essencial de *Lippia alba* na primavera (0,54%) e verão (0,38%).

Não foi observado o efeito dos adubos em relação ao teor de óleo em nenhuma das épocas de colheita. Contudo, trabalhos com outras plantas medicinais têm demonstrado efeito positivo da adubação orgânica e fertilizantes químicos no teor de óleo essencial, tais como: *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Rahime e Kamali, 2012), *Pogostemon cabin* (Blanco) Benth (Singh et al., 2009), *Ammi majus* (Ahmad et al., 2007) e *Pogostemon cablin* (Puttanna et al., 2005). Contudo, ao analisar o rendimento de óleo essencial (Tabela 5) verificou-se que houve diferença estatística em função do tipo de adubo e época de colheita. Nos meses de julho e outubro o rendimento foi superior quando comparado com janeiro e abril, considerando que neste mesmo período a produção de folha também foi significativa. O maior efeito da adubação foi verificado na última colheita, onde a adubação mineral (158,74 Kg ha⁻¹) promoveu média superior à adubação orgânica (97,86 Kg ha⁻¹) e controle (107,65 Kg ha⁻¹). Rosal et al. (2009), observaram aumento significativos na produção de óleo essencial de *P. neochilus* com aumento da biomassa vegetal. Segundo Sangwan et al. (2001), a aplicação de fertilizantes minerais ou orgânicos em plantas aromáticas normalmente afeta a produtividade de óleos essenciais devido à maior produção de biomassa, que eleva o rendimento de princípios ativos por planta e conseqüentemente por área.

3. Teor de macronutrientes nas folhas

Os teores dos macronutrientes presente nas folhas+inflorescência de *Lippia origanoides* variaram entre as épocas de colheita e tipo de adubação, corroborando com os resultado obtidos para a produção da matéria seca foliar (Tabela 7). A análise revelou que para N (13,61-20,92 g kg⁻¹), K (10,98-15,81 g

kg⁻¹), Ca (8,45-15,45 g kg⁻¹) e S (1,20-1,98 g kg⁻¹) não foram observadas diferença estatística entre plantas do tratamento controle e dos tratamentos com adubação, mas constatou-se diferença entre os meses de coleta (Tabela 7). Já para o P e Mg verificou-se diferenças no teor nas duas variáveis analisadas (adubação e colheita), com maior teor de fósforo (P) nas plantas adubadas com composto orgânico na segunda e terceira colheita (2,12 g kg⁻¹ e 1,92 g kg⁻¹, respectivamente) e magnésio (Mg) na adubação orgânica (2,90 g kg⁻¹) não diferiu significativamente do controle (3,40 g kg⁻¹), na segunda colheita. Os teores de N e P encontrados em *Lippia origanoides* estão próximos dos encontrados por Gama (2011) em espécie da mesma família, *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., apresentando valores médios de 13,08-20,88 g kg⁻¹ para N e 0,95-2,08 g kg⁻¹ para P.

TABELA 7. Teor (g kg⁻¹) de macronutrientes das folhas+inflorescência de plantas cultivadas de *Lippia origanoides* H.B.K em função da época de colheita e tipos de adubação. Feira de Santana-Ba, 2012.

| Variáveis | Adubação | Época de Colheita | | | |
|-----------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | Janeiro | Abril | Julho | Outubro |
| | | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ | g kg ⁻¹ |
| N | Controle | 19,47 Aa | 19,81 Aa | 17,06 Aab | 13,61 Ab |
| | Adubação orgânica | 17,20 Abc | 23,08 Aa | 20,22 Aab | 15,69 Ac |
| | Adubação mineral | 20,91 Aa | 20,92 Aa | 17,31 Aab | 14,20 Ab |
| P | Controle | 1,25 Ab | 1,85 Ba | 1,66 Aa | 1,75 Aa |
| | Adubação orgânica | 1,28 Ac | 2,12 Aa | 1,92 Aa | 1,83 Ab |
| | Adubação mineral | 1,24 Ac | 2,00 ABa | 1,69 Ab | 1,85 Aab |
| K | Controle | 11,47 Ab | 13,00 Ab | 15,81 Aa | 13,51 Aab |
| | Adubação orgânica | 10,98 Ab | 13,77 Aa | 14,28 Aa | 14,02 Aa |
| | Adubação mineral | 11,22 Ab | 14,02 Aa | 14,02 Aa | 14,53 Aa |
| Ca | Controle | 15,45 Aa | 11,71 Aab | 10,20 Ab | 8,85 Ab |
| | Adubação orgânica | 14,81 Aa | 10,73 Ab | 11,90 Aab | 10,06 Ab |
| | Adubação mineral | 14,65 Aa | 10,85 Aab | 11,36 Aab | 8,45 Ab |
| Mg | Controle | 3,63 Aa | 3,40 Aa | 2,46 Ab | 2,00 Ab |
| | Adubação orgânica | 4,00 Aa | 2,90 ABb | 2,43 Abc | 2,23 Ac |
| | Adubação mineral | 3,53 Aa | 2,73 Bb | 2,40 Ab | 1,66 Ac |
| S | Controle | 1,65 Aab | 1,98 Aa | 1,47 Abc | 1,20 Ac |
| | Adubação orgânica | 1,69 Aab | 1,86 Aa | 1,72 Aa | 1,30 Ab |
| | Adubação mineral | 1,69 Aab | 1,80 Aa | 1,58 Aab | 1,30 Ab |

Médias seguidas da mesma letra na coluna (maiúscula) e na linha (minúscula) não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

Os teores de nutrientes foliares para todos os elementos analisados, com exceção do K, apresentaram valores superiores nas primeiras colheitas, nos meses de janeiro e abril, reduzindo nas últimas colheitas, nos meses de julho e outubro, sendo que o P, ao inverso do N, aumentou em função da idade da planta. Esses resultados indicam a necessidade desses elementos nos estágios iniciais da planta, principalmente do N para formação de proteínas e outros compostos essenciais para o crescimento e desenvolvimento da espécie (MARSCHNER, 1995). Gama (2011) avaliando dois ciclos de colheita da *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. observou também variação dos teores de N, K e P, encontrando maiores médias no primeiro ciclo da planta.

As plantas adubadas proporcionaram maior quantidade de fósforo (0,08 g) no mês de abril, mesmo período onde também foi verificado maior teor de óleo essencial. Segundo Cardoso et al. (2001), este elemento exerce um papel fundamental na síntese de monoterpenos, sendo de extrema importância para espécies medicinais produtoras de óleo essencial, onde os monoterpenos perfazem 90% da sua composição.

4. Taxa de crescimento

A taxa de crescimento relativo (TCR), em relação à altura da planta e diâmetro do caule revelou que a aplicação dos adubos não influenciou a variação de crescimento inicial da *Lippia organoides* quando comparado com o tratamento sem adubação (Tabela 8). A TCR de plantas entre as épocas de colheita para altura apresentou um ganho superior no primeiro mês, não diferindo nos demais períodos, enquanto que para o diâmetro do caule, obteve médias semelhantes nos dois primeiros meses, reduzindo a taxa de crescimento pela metade nos últimos meses de colheita.

TABELA 8. Taxa de Crescimento Relativo (TCR) de plantas cultivadas de *Lippia origanoides* H.B.K em função da época de colheita e tipo de adubação. Feira de Santana-Ba, 2012.

| Variáveis | Adubação | Época de colheita | | | |
|---|-------------------|-------------------|----------|----------|----------|
| | | Janeiro | Abril | Julho | Outubro |
| TCR em altura (cm cm ⁻¹ .dia ⁻¹) | Controle | 0,015 Ba | 0,010 Ab | 0,010 Ab | 0,010 Ab |
| | Adubação orgânica | 0,016 Aa | 0,010 Ab | 0,010 Ab | 0,010 Ab |
| | Adubação mineral | 0,017 Aa | 0,010 Ab | 0,010 Ab | 0,010 Ab |
| TCR em diâmetro do caule (mm mm ⁻¹ .dia ⁻¹) | Controle | 0,010 Aa | 0,010 Aa | 0,005 Ab | 0,005 Ab |
| | Adubação orgânica | 0,010 Aa | 0,010 Aa | 0,006 Ab | 0,005 Ab |
| | Adubação mineral | 0,010 Aa | 0,010Aa | 0,005Ab | 0,005 Ab |
| TRC em Peso seco (g g ⁻¹ .dia ⁻¹) | Controle | 0,040 Aa | 0,024 Ab | 0,020 Ab | 0,016 Bb |
| | Adubação orgânica | 0,040 Aa | 0,024 Ab | 0,020 Ab | 0,016 Bb |
| | Adubação mineral | 0,040 Aa | 0,025 Ab | 0,020 Ab | 0,020 Ab |

Médias seguidas da mesma letra na coluna (maiúscula) e na linha (minúscula) não difere significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

A taxa de crescimento relativo (TCR) em relação à matéria seca total revelou um incremento inicial de 0,040 g.g¹ dia⁻¹ sendo superior às demais épocas de colheita. O efeito da adubação foi detectado apenas no último mês de avaliação, onde se constatou menor acúmulo diário de biomassa no tratamento controle e adubação orgânica (0,016 g g¹. dia⁻¹), sendo estatisticamente diferente dos resultados obtidos com adubação mineral, que promoveu TCR de 0,020 g g¹dia⁻¹. Ao longo do período pode-se observar uma redução de 60% entre a primeira e última colheita para o tratamento controle e adubação orgânica e 50% para adubação mineral.

A TCR revela o quanto à planta desenvolveu-se durante um determinado período, considerando os valores pré-existentes, permitindo avaliar de forma indireta a eficiência da planta na assimilação líquida de carbono durante um intervalo de tempo (CAIRO et al., 2008). Os resultados obtidos neste trabalho apontam um efeito positivo no crescimento inicial da *Lippia origanoides*, onde as melhores taxas foram observadas no quinto mês de cultivo da espécie (janeiro). O aumento da TCR pode ser atribuído à elevação da taxa fotossintética das plantas

ou à redução da taxa respiratória (BARREIRO et al., 2006; POVH e ONO, 2008), o que permite um rápido crescimento e desenvolvimento da planta em campo.

CONCLUSÕES

Para as condições em que o experimento foi realizado, pode-se concluir que:

- A época de colheita afeta o crescimento, acúmulo de minerais nas folhas, teor e rendimento de óleo da espécie *Lippia origanoides*;
- A adubação mineral possibilita maior produção de biomassa total nas plantas de *Lippia origanoides*;
- Temperatura e umidade são fatores climáticos que mais afetam o teor de óleo essencial nas folhas e inflorescência de *Lippia origanoides*;
- O maior rendimento de óleo essencial pode ser obtido nos meses de julho e outubro, período de maior produção de biomassa foliar.

REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AHMAD, S., I.S. FAZLI, A. JAMAL, M. IQBAL AND M.Z. ABDIN. Interactive effect of sulfur and nitrogen on nitrate reductase and ATPsulfurylase activities in relation to seed yield from *Psoralea corylifolia* L. **Journal Plant Biology**, v. 50, p. 351-357, 2007.

AHMED, Y.M.; SHABALY, E.A.; SHANAN, N. The use of organic and inorganic cultures in improving vegetative growth, yield characters and antioxidant activity of roselle plants (*Hibiscus sabdariffa* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1988-1996, 2011 *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(11), pp. 1988-1996, 14 March, 2011

ALVAREZ-CASTELLANOS, P.P., PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. **Industrial Crops and Products**, v.17, 77-81, 2003.

ASA BRASIL. Articulação do semiárido brasileiro. Disponível em: <http://www.asabrasil.org.br/>. Acesso em 16 nov. 2010.

AZIZI, A.; YAN, F.; HONERMEIER, B. Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. **Industrial Crops and Products**, 29, p. 554–561, 2009.

BARREIRO, A.P. et al. Análise de crescimento de plantas de manjeriço tratadas com reguladores vegetais. **Bragantia**, v. 65, n. 4, p. 563-567, 2006.

BLANK, A.F.; SANTANA, T.H.B.; BLANK, M.F.A.; CRUZ, E.M.O. Influência do estágio de desenvolvimento em Genótipos de Sambacaitá (*Hyptis pectinata* L. Poit). **Scientia Plena**, V. 7, n.7, 070201, 2011.

BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; FERRAZ, V.; , S. K. V.; FIGUEIREDO, F. C. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* EpL. Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

CAIRO, P.A.R.; OLIVEIRA, L.E.M.; MESQUITA, A.C. **Análise de Crescimento de Plantas**. 1 ed, Vitória da Conquista: Edições UESB, 2008, 72p.

CARDOSO, M.G.; SHAN, A.Y.K.V.; SOUZA, J.A. **Fitoquímica e Química de Produtos Naturais**. Lavras:Universidade Federal de Lavras, 2001. 67p.

CHAGAS, J.H.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; SANTOS, F.M. Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 327-334, 2011.

COSTA, L.C.B.; ROSAL, L.F.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. Efeito da adubação química e orgânica na produção de biomassa e óleo essencial em capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, p.16-20, 2008.

DUFAULT, R.J.; RUSHING, J.; HASSELL, R.; SHEPARD, B.M.; MCCUTCHEON, G.; WARD, B. Influence of fertilizer on growth and marker compound of field-grown Echinacea species and feverfew. **Scientia Horticulturae**, 98, p. 61–69, 2003.

EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro, 1979.

EWULO, B.S. Effect of Poultry Dung and Cattle Manure on Chemical Properties of Clay and Sandy Clay Loam Soil . **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.4, p. 839-84, 2005.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4.1 pacote computacional)

FIGUEIREDO, L.S.; BONFIM, F.P.G.; SIQUEIRA, C.S.; FONSECA, M.M.; SILVA, A.H.; MARTINS, E.R. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p.154-158, 2009.

GAMA, EVG. 2011. **Biomassa, óleo essencial e nutrição de *Lippia Alba* (Mill) N.E.Br. em função da adubação com compostos orgânicos inoculados sem inoculação de actinomicetos**. 2011. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

HUSSEIN, M.S.; EL-SHERBENY, S.E.; KHALIL, M.Y.; NAGUIB, N.Y.; ALY, S.M. Growth characters and chemical constituents of *Dracocephalum moldavica* L. plants in relation to compost fertilizer and planting distance. **Scientia Horticulturae**, 108, p. 322-331, 2006.

HUSSAIN, A.I., ANWAR, F., SHERAZI, S.T.H., PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, p. 986–995, 2008.

KHALIL, M.Y., EL-SHERBENY, S.E. Improving the productivity of three *Mentha* species recently cultivated under Egyptian condition. **Egyptian Journal Applied Sciences**, v.18, n.1, p. 285–300, 2003.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 1985. 482p.

KIEHL, E.J. **Adubação orgânica: 500 perguntas e 500 respostas**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2008. 227p.

MAIA, S.S.S; PINTO, J.E.B.P; SILVA, F.N.; OLIVEIRA, C. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo do bamburral (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, n.4, p. 327-331 2008.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. London: Academic Press. 1995. 674p.

MAY, A.; SUGUINO, E.; MARTINS, A.N.; BARATA, L.E.S.; PINHEIRO, M.Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n. 2, p. 195-200, 2010.

MYERS, N.; MILTTERMEIER, R. A.; MILTTERMEIER, C. G.; FONSECA, G.A.B.; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, n. 24, p.853-858, 2000.

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 28, n.3, p.273 – 278, 2007.

OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H. B. K. **Food Chemistry**, Rio de Janeiro, p. 236-240, 2007.

PASCUAL, M.E. et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

POVH, J.A.; ONO, E.O. Crescimento de plantas de *Salvia officinalis* sob ação de reguladores de crescimento vegetal. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2186-2190, 2008.

PUTTANNA, K.; PRAKASH RAO, V.S.; GANESHA RAO, R.S., GOPINATH, C. T.; RAMESH S. Effect of shade and nitrogen on herb yield and longevity of Patchouli (*Cymbopogon cablin*). **Journal of Medicinal and Aromatic. Plants.**, v.25, p. 297-300, 2005.

PRABHAKAR, J.H.A. et al. Impact of organic manure and chemical fertilizers on artemisinin content and yield in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, v.33 p. 296–301, 2011.

RAHIMI, A.; KAMALI, M. Different Planting Date and Fertilizing System Effects on the Seed Yield, Essential Oil and Nutrition Uptake of Milk Thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn). **Advances in Environmental Biology**, 6, p. 1789-1796, 2012.

RAIJ, B. VAN.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, G.A.; Furlani, A.M.C. **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**, 2 .ed. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundação IAC, 1996.285p. Boletim Técnico 100.

ROSAL L.F., PINTO J.E.B.P.; BRANT R.S. Produção de biomassa e óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schlechter cultivado no campo sob níveis crescentes de adubo orgânico. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, v.2, p.39-44, 2009.

SALIMENA, F.R.G., Thode, V., Mulgura, M., O'Leary, N. **Verbenaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB021449> . Acesso em: 05 jan. 2013

SANGWAN, N.S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, n.34, p.3-21, 2001.

SANTOS, A.S. et al. Embrapa Amozônia Ocidental. **Informe técnico**: Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Belém, 2004. p.6. Disponível em: <www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online>. Acesso em: 18 mar.2009.

SANTOS JÚNIOR, J.D.G.; MONTEIRO, F.A.; LAVRES JÚNIOR, J. Análise de crescimento de capim-marandu submetido a doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.23-26, 2004.

SOUZA, M. F. et al. Calagem e adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial em *Lippia citriodora* Kunth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.401-405, 2010.

SINGH, M.; RAO, R.S.G. Influence of source and doses of N and K on herbage, oil yield and nutrient uptake of patchouli (*Pogostemon cabin* (Blanco) Benth.) in semiarid tropics. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 229-234, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. **819p**

TANU; PRAKASH, A.; ADHOLEYA, A. Effect of different organic manures/composts on the herbage and essential oil yield of *Cymbopogon winterianus* and their influence on the native AM population in a marginal alfisol. **Bioresource Technology**, 92, p. 311–319, 2004.

YANG, J.; XIANGYANG, L.; SHI, Y. Effect of Different Mixed Fertilizer on Yield, Quality and Economic Benefits in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Food Science and Technology**, v. 5, p. 588-591, 2013.

WANG, H.; LIU, Y.; WEI, S.; YAN, Z. Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, p. 229–23, 2012.

CAPÍTULO 2

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K EM FUNÇÃO DO TIPO DE ADUBAÇÃO E DA ÉPOCA DE COLHEITA¹

¹ Artigo ajustado e aceito pelo Comitê Editorial do periódico científico Industrial Crops and Products

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K EM FUNÇÃO DO TIPO DE ADUBAÇÃO E ÉPOCA DE COLHEITA

Autora: Simone Teles

Orientadora: Dra.Franceli da Silva

RESUMO: Os compostos presentes nos óleos essenciais têm demonstrado atividades biológicas importantes, o que tem estimulado pesquisas para geração de novos produtos. Contudo, um dos grandes entraves da utilização dos óleos têm sido a variabilidade na composição química, que é alterado por fatores relacionados ao cultivo, época de colheita da planta, fatores climáticos e parte da planta utilizada, afetando diretamente sua segurança e eficácia. Para tanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adubação mineral e orgânica e das épocas de colheita sobre a composição química e atividade antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. O experimento foi instalado no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, utilizando o delineamento experimental em blocos casualizados com parcelas subdivididas no tempo, sendo as parcelas os tipos de adubo (mineral e orgânico) e as subparcelas às épocas de colheita (janeiro, abril, julho e outubro). As extrações do óleo essencial das folhas de *Lippia origanoides* foram realizadas através da hidrodestilação durante 3 horas, com uso do Aparelho Tipo Clevenger. O óleo essencial extraído foi analisado por Cromatografia de Fase Gasosa acoplada ao Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) e de Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM). A atividade antioxidante foi determinada por meio de três ensaios químicos: Poder Redutor, captura dos radicais 2,2-diphenylpicrylhydrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazoli-na-6-ácido sulfônico)-ABTS. Os resultados demonstraram que foi possível identificar 27 compostos do óleo essencial de *Lippia origanoides*, destacando-se entre eles sete compostos majoritários: carvacrol (45,7%), linalol (8,7%), p-cimeno (6,5%), γ -terpineno (5,9%), (E)-cariofileno (4,7%), biciclogermacreno (3,8%) e timol (3,1%). Ao longo da colheita foi possível observar a redução das concentrações do carvacrol e o aumento do linalol. Nos diferentes períodos de colheita analisados, constatou-se a influência positiva da adubação no aumento das concentrações dos compostos: p-cimeno, timol e linalol. Respostas positivas para atividade antioxidante foram apresentadas nos três métodos testados. As maiores atividades para o poder redutor EC_{50} (1,87 mg mL⁻¹), DPPH EC_{50} (0,45 mg mL⁻¹) e ABTS EC_{50} (0,13 mg mL⁻¹) foram verificadas na primeira colheita em plantas submetidas a adubação mineral, controle e adubação orgânica, respectivamente. Conclui-se que a adubação e época de colheita influenciaram quantitativamente a composição do óleo essencial e a atividade antioxidante.

Palavras-chave: óleo essencial, carvacrol, *Lippia origanoides*

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM *Lippia origanoides* H.B.K. ACCORDING TO THE FERTILIZATION TREATMENT AND HARVEST SEASON

Author: Simone Teles

Supervisor: Dra. Franceli da Silva

ABSTRACT: The components present in essential oils demonstrate important biological activities for its increment in the generation of new products. However, one the greatest barriers of their use is the variability of essential oils chemical composition, that modifies due to factors related to cultivation, harvest season, climatic factors and part of the plant used, affecting directly the safety and efficacy. For such, the present work had the objective to evaluate the effect of mineral and organic fertilization and of different harvest seasons over the chemical composition, and antioxidant activity of the essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K.. The experiment was installed in the Horto Florestal of the State University of Feira de Santana – Bahia, being used the experimental outline in randomized blocks in the scheme of parcels subdivided in time, being the parcels the type of fertilization (mineral and organic) and the sub-parcels the harvest seasons (January, April, July, and October). The essential oils extraction from leaves of *Lippia origanoides* were made by hydro-distillation in a Clevenger-type apparatus during 3 hours. The extracted essential oils were analyzed by gas chromatography with a flame ionization detector (GC/FID) and by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS). The antioxidant activity was determined by three different chemical assays: reducing power, scavenging capacity of 2,2-diphenylpicrylhydrazil (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS). The results demonstrated that was possible to identify 27 compounds of *Lippia origanoides* essential oils, being the main components: carvacrol (45.7%), linalool (8.7%), *p*-cymene (6.5%), γ -terpinene (5.9%), (E)-caryophyllene (4.7%), bicyclogermacrene (3.8%), and thymol (3.1%). During harvest season it was possible to observe the reduction in the concentrations of carvacrol and the increase of linalool. In the different harvest seasons, by analyzing the main compounds found, it was observed a positive influence of the fertilization in the concentration increase of *p*-cymene, thymol, and linalool. Positive responses regarding antioxidant activity were presented in the three assays tested. The sample with higher activity in reducing power EC₅₀ value (1.87 mg mL⁻¹), DPPH EC₅₀ value (0.45 mg ml⁻¹) and ABTS EC₅₀ value (0.13 mg ml⁻¹) was verified in the first harvest season in plants submitted to mineral fertilization, control and organic fertilization respectively. It was concluded that fertilization and harvest season influenced quantitatively the composition and antioxidant activity of essential oils.

Keywords: essential oil; carvacrol; *Lippia origanoides*

INTRODUÇÃO

A espécie *Lippia origanoides* H.B.K, conhecida popularmente como alecrim-do tabuleiro, é largamente utilizada na medicina popular, onde suas folhas são usadas em forma de infusão no tratamento de dor de estômago, flatulência e indigestão e também como expectorante em infecções nos brônquios e pulmões e, sendo recomendada contra asma, tuberculose, antiespasmódico (GARCÍA-BARRIAGA, 1992; STASHENKO et al., 2010). É uma espécie rica em óleo essencial, apresentando alta variabilidade quanto ao teor, entre 1,0% a 4,6 % (OLIVEIRA et al., 2007; CAVALCANTE et al., 2009). Essa variação também pode ser observada na sua composição química, apresentando três quimiotipos devido à presença de compostos majoritários distintos: carvacrol e timol, α - e β -felandreno, p -cimeno e limoneno (STASHENKO et al., 2010). A presença do carvacrol e timol conferem a essa espécie ação antimicrobiana contra fungos e bactérias, como também propriedades antioxidantes (HYLDGAARD et al., 2012). Em estudo feito por Celis et al. (2007) com três espécies da família Verbenaceae, destacou a *Lippia origanoides*, por sua baixa toxicidade e capacidade de capturar radicais livres.

Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio são fundamentais no metabolismo celular, mas o excesso pode gerar estresse oxidativo, levando às alterações teciduais responsáveis por diversas doenças como as cardiovasculares, neurológicas, câncer, diabetes entre outras (MALHEIRO et al., 2012). Contudo, há vários sistemas não enzimáticos que contribuem para a inativação das reações de radicais livres, como os antioxidantes. Os compostos presentes na maioria dos óleos essenciais são reconhecidos como poderosos antioxidantes naturais e tem despertado o interesse de muitos pesquisadores como candidatos a substitutos dos antioxidantes sintéticos (MIMICA-DUKIC et al., 2004; CAVAR et al., 2008; CASIAN et al., 2010).

Apesar do uso de produtos sintéticos por mais de cinco décadas pela indústria de alimentos, a exemplo do butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG), utilizados para retardar o processo de auto-oxidação, existe crescente interesse em estudos de aditivos naturais, incluindo os antioxidantes (ROBY et al., 2013), principalmente devido

aos efeitos adversos dos produtos sintéticos sobre a saúde humana, como o aumento do colesterol, aumento do fígado e indução de câncer do fígado, entre outros (RE et al., 1999; SANTOS, et al., 2004). A busca dos consumidores por produtos naturais com atividade antioxidante tem estimulado a indústria alimentícia na utilização dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

Neste sentido, as plantas medicinais e aromáticas podem ser uma alternativa promissora para a indústria farmacêutica e de alimentos para a inserção dos produtos naturais no mercado, livre de substâncias sintéticas. Vários estudos com espécies de plantas têm apontando para efeitos positivos relacionados à atividade antioxidante, como, por exemplo: *Arbustus unedo* (MALHEIRO et al., 2012); *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia stricta* (AMMAR, et al., 2012); *Aniba rosaeodora*, *Aniba panurensis*, *Licaria martiniana* (ALCÂNTARA et al., 2010) *Cinnamomum camphora* (CANSIAN ET AL., 2010); *Psidium guajava* (VICENTINO e MENEZES, 2007); *Melissa officinalis* (MIMICA-DUKIC et al., 2004); *Origanum vulgare* (BOZIN et al., 2006); *Ginko biloba* (MENSOR, 2001).

Devido ao grande potencial observado na *Lippia origanoides*, tanto na medicina popular quanto nas pesquisas científicas, estudos na área de agronomia são necessários para viabilizar o fornecimento de matéria prima em quantidade e qualidade, necessárias à sustentação do mercado dos produtos que poderão ser originados. Um dos grandes entraves do mercado dos óleos essenciais é a variação na composição química dos óleos, que se modificam por fatores relacionados ao cultivo e época de colheita da planta, como fatores climáticos, parte da planta utilizada, método de transporte, armazenamento, secagem e processo de extração, afetando diretamente a segurança e eficácia (FERREIRA, 1998; CALIXTO, 2000).

Em vista do interesse econômico relativo aos componentes aromáticos das plantas medicinais, e o potencial de *Lippia origanoides*, o presente trabalho objetivou avaliar a composição química e atividade antioxidante do óleo essencial da espécie em função dos tipos de adubação e época de colheita.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Produção de mudas e identificação da espécie

O experimento foi conduzido na Unidade Experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS, Bahia. Esta unidade situa-se a 234 metros de altitude, na latitude de 12°16'00" Sul e longitude de 38°58'00" Oeste, apresentando pluviosidade média de 750 mm por ano e temperatura variando em torno de 26°C. Segundo a classificação de Köppen, o clima local é do tipo BSh, semiárido quente.

As mudas de *Lippia organoides* H.B.K foram obtidas por estaquia da planta matriz da coleção de plantas aromáticas da referida unidade experimental. A espécie foi identificada pela taxonomista Tânia Regina dos Santos Silva (UEFS), com exsicata incorporada no Herbário da UEFS (HUEFS) com voucher número 83.373. No momento do plantio, as estacas tiveram dois centímetros de suas bases imersas em solução de ácido indolbutírico (AIB) na concentração de 250 mg L⁻¹ por 5 min. Decorrido esse tempo, as estacas foram colocadas em bandejas de poliestireno com 128 células, preenchidos pela mistura de vermiculita e substrato Biomix[®] na proporção 1:1. Quizenalmente, as mudas foram adubadas com Vitaplan, fertilizante misto (13-N;13-P₂O₅;15-K₂O) com micronutrientes. Após 41 dias, as mudas foram transferidas para copos descartáveis de 200 mL contendo composto orgânico produzido no local do experimento (Figura 1), onde permaneceram por mais 60 dias. Durante todo este período as mudas permaneceram em casa de vegetação com nebulização intermitente.



FIGURA 1. A - Casa de Vegetação do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS; B - Estacas de *Lippia origanoides* H.B.K. cultivadas em bandejas de poliestireno; C - Mudas de *Lippia origanoides* H.B.K. cultivadas em copos plásticos de 200mL . Feira de Santana-BA, UEFS, 2011.

2. Implantação do experimento e delineamento experimental

O ensaio foi instalado no campo em 10 de agosto de 2011, utilizando o delineamento experimental em blocos casualizados no esquema de parcela subdividida no tempo, com quatro repetições. Na parcela foram avaliados dois tipos de adubos (orgânico e mineral) e o tratamento controle, sem adubação. Nas subparcelas foram avaliadas as épocas de colheita, totalizando quatro coletas (janeiro, abril, julho e outubro). O experimento constitui-se de 48 parcelas e 6 plantas em cada área útil (Figura 2).

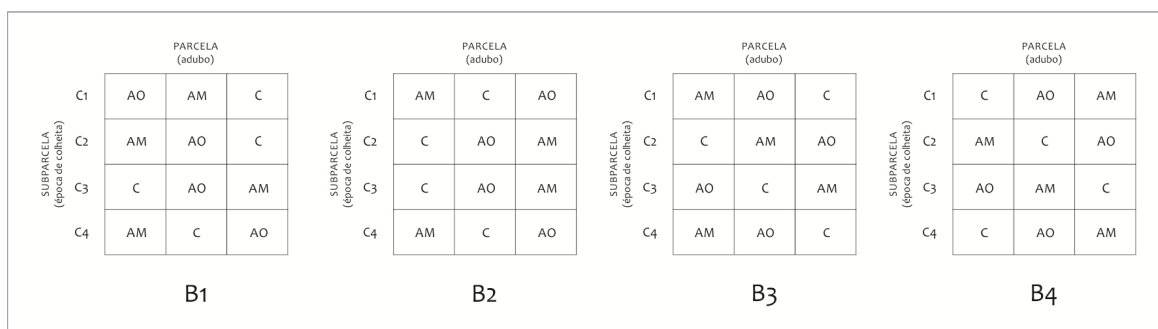


FIGURA 2. Esquema Experimental. Feira de Santana-BA, UEFS, 2011.

Três meses antes do plantio procedeu-se a coleta de amostras para análise química do solo, realizada no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas-BA, segundo metodologia descrita no manual de análise do solo (EMBRAPA, 1979). O resultado da análise química encontra-se descrita na Tabela 1.

TABELA1. Resultado da análise química do solo da área experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana/BA.

| M.O | pH | P | K | Ca+Mg | Ca | Mg | Al | H+Al | Na | S | CTC | V |
|------|-------------------|---------------------|-----------------------|-------|-----|-----|-----|------|------|------|------|----|
| % | CaCl ₂ | mg dm ⁻³ | Cmol dm ⁻³ | | | | | | % | | | |
| 0,29 | 4,9 | 6 | 6 | 2,4 | 1,7 | 0,7 | 0,1 | 2,64 | 0,24 | 2,91 | 5,55 | 52 |

Para implantação das mudas na área experimental foi utilizado o espaçamento de 1,0 m entre linhas por 0,5 m entre plantas. As parcelas foram dispostas em filas duplas ocupando uma área útil de 6,0 m². O adubo mineral utilizado foi a formulação 10-10-10 (N, P₂O₅ e K₂O) e o superfosfato simples (Figura 3). Conforme a recomendação de Van Raij et al (1996) e baseado na análise do solo, utilizou-se 80, 200, 80 Kg ha⁻¹ (N, P₂O₅ e K₂O) via adubação mineral. Metade dos nutrientes foi aplicado no momento do plantio e a outra metade trinta dias após o plantio. Como fonte de adubação orgânica utilizou-se composto orgânico oriundo de resíduos vegetais produzido no local do experimento, na quantidade equivalente a 10 t ha⁻¹, aplicado na cova no momento do plantio (Figura 3). Como controle utilizou-se parcelas sem aplicação de

fertilizante químico ou orgânico. A análise química do composto orgânico descrita na Tabela 2 foi realizada no Departamento de Solos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-ESALQ, Piracicaba, São Paulo.



FIGURA 3. A – Aplicação do adubo orgânico na cova; B – Aplicação do adubo mineral na cova. C – Muda de *Lippia origanoides* H.B.Kem campo; D – Área experimental. Feira de Santana-BA, UEFS, 2011.

TABELA 2. Análise química do composto orgânico utilizado na área experimento do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana/BA.

| | |
|--|------|
| pH (CaCl ₂ 0,01M) | 6.8 |
| Densidade (g/cm ³) | 0.78 |
| Umidade total (%) | 26.7 |
| Relação C/N (carbono total e N total) | 11/1 |
| | % |
| Matéria orgânica total | 14.4 |
| Carbono total | 8.00 |
| Nitrogênio total | 0.73 |
| Fósforo (P ₂ O ₅) total | 0.19 |
| Potássio (K ₂ O) | 0.11 |
| Cálcio (Ca) total | 1.08 |
| Magnésio (Mg) total | 5.55 |
| Enxofre (S) total | 0.08 |

Durante todo período de cultivo, foram realizadas capinas manuais em número suficiente para o controle das plantas espontâneas. Inicialmente a irrigação foi manual, duas vezes ao dia, até o pegamento das mudas em campo. Após seu estabelecimento, adotou-se o sistema de irrigação por aspersão para manutenção da umidade do solo.

3. Colheita

Aos 150 dias de cultivo no campo, janeiro/2012, realizou-se a primeira colheita, entre 8 e 9 horas da manhã, cortando-se a parte aérea das plantas 5 cm acima do solo (Figura 4). Ao longo do experimento foram realizadas quatro colheitas, com intervalos regulares de 90 dias contados a partir da primeira coleta, correspondentes aos meses de janeiro, abril, julho e outubro. Foram utilizadas amostras de quatro plantas em cada tratamento.

Após a colheita, foi realizada a separação do caule, folha+inflorescência. Em seguida as folhas+inflorescências foram acondicionadas em sacos de papel e conduzidas à estufa com circulação forçada de ar a 40°C até peso constante (Figura 4).



FIGURA 4. A – *Lippia origanoides* H.B.K, mês de abril; B – Colheita manual; C- Separação das Folhas+Inflorescência e caule; D- Secagem em estufa com circulação forçada de ar. Feira de Santana-BA, UEFS, 2012.

4. Extração do Óleo Essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação no Laboratório de produtos naturais (LAPRON) do Departamento de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS.

Parte do material seco foi separado para determinação do teor de umidade. O procedimento foi realizado em triplicata no determinador de umidade (Série ID Versão 1.8 Marte®.); onde cada repetição continha 1g do material. As amostras

foram secas a temperatura de 100°C, até que não houvesse variação na pesagem de 0,1% em 30 s.

Para extração do óleo essencial amostras de 100g de folhas+ inflorescência previamente secas e trituradas rapidamente no liquidificador industrial foram adicionadas em balão de vidro de 5 litros contendo água destilada em volume suficiente para cobertura total do material vegetal, iniciando o processo de hidrodestilação. Foram adotados aparatos do tipo Clevenger graduados, acoplados em balões de vidro, que foram aquecidos por mantas térmicas elétricas com termostato (Figura 5). O processo de extração foi conduzido durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota, sendo verificado o volume de óleo extraído na coluna graduada do aparelho de Clevenger. Com objetivo de remover a água residual foi adicionado ao óleo essencial sulfato de sódio anidro para evitar perdas por hidrólise durante o armazenamento. Posteriormente, com o uso de pipeta do tipo Pasteur, o óleo foi acondicionado em frasco de vidro de 2 mL envolto com papel alumínio, etiquetado e armazenado em congelador comercial a -5 °C ao abrigo da luz até a realização da análise química.

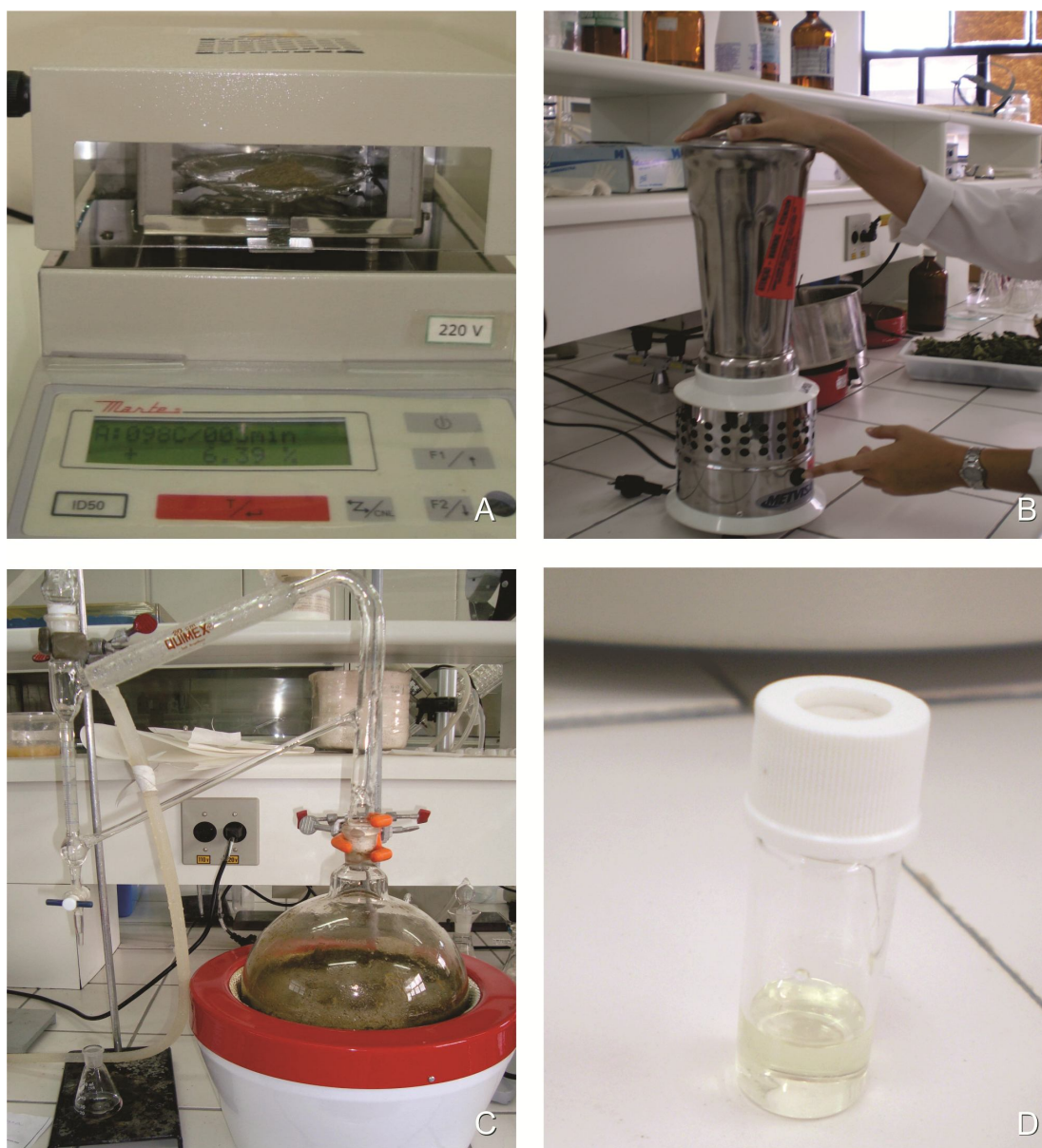


FIGURA 5. A – Determinador de umidade; B – Trituração das folhas+inflorescência de *L. origanoides*; C- Hidrodestilação em aparato tipo Clevenger; D- Óleo essencial obtido após 3 horas de destilação. Feira de Santana-BA, UEFS, 2012.

O teor do óleo essencial foi calculado a partir da base livre de umidade (BLU), que corresponde ao volume (mL) de óleo essencial em relação à massa seca da amostra, conforme metodologia proposta por Santos et al. (2004) (Equação 2).

$$T_o = \frac{V_o}{B_m - \frac{(B_m \times U)}{100}} \times 100$$

Onde:

T_o = Teor de óleo (%)

V_o = Volume de óleo extraído

B_m = Biomassa aérea vegetal

$(B_m \times U)$ = Quantidade de umidade presente na biomassa

EQUAÇÃO 2: Cálculo do teor de óleos essenciais.

Para o cálculo do rendimento de óleo por hectare multiplicou-se a produção estimada por hectare da biomassa das folhas e inflorescências pelo teor de óleo essencial

5. Identificação dos Componentes Químicos do Óleo Essencial

Para a análise da composição química, 20 mg do óleo essencial foram previamente diluídos em 1 mL de acetato de etila. Na análise por CG/DIC foi utilizado um Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 equipado com injetor automático AOC-20i, coluna capilar Rtx-5 (30 m x 0.25 mm), espessura do filme 0.25 µm, temperatura do injetor 220 °C e do detector 240 °C, hélio como gás de arraste (1.2 mL min⁻¹), com programa de temperatura do forno de 60 a 240 °C a 3 °C.min⁻¹, mantendo a 240 °C por 20 min, split de 1:20, volume de injeção de 1 µL.

As análises por CG/EM foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu®, com injetor automático AOC-20i, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0.25 mm), espessura do filme 0.25 µm, temperatura do injetor 220°C, gás de arraste hélio (1 mL min⁻¹), temperatura da interface e da fonte de ionização 240°C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização 0.7 kV e programa de temperatura e split semelhante a descrita acima.

A identificação dos constituintes foi realizada através do cálculo do índice de Kovats de cada um dos picos e pelos dados de espectrometria de massas. Os índices foram calculados com a utilização de cromatogramas obtidos pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcenos (C₈ a C₂₄). Cada pico do cromatograma foi também identificado pelo seu espectro de massas, pela comparação com a biblioteca do equipamento, pela consulta da literatura especializada (ADAMS, 2007; JOULAIN e KONIG, 1998) e pela injeção de padrões. Já a quantificação dos constituintes identificados foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes utilizando-se o método da normalização.

6. Atividade antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante foi determinada por três métodos químicos: o efeito bloqueador de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] e pelo método do Poder Redutor.

6.1 Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH

Avaliação da capacidade para bloquear os radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), foi realizada de acordo com o método descrito por Hatano et al. (1988). Para a análise preparou-se primeiramente uma solução de DPPH a 0,0024% e separou-se 3mL de metanol para ser utilizado como branco. Foi empregado como controle do DPPH a reação de 300 µL de metanol com 2,7 mL de DPPH. Na análise da atividade antioxidante das amostras, 2,7 mL de DPPH foram adicionados a 300 µL de cada concentração previamente preparada (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 10 e 25 mg mL⁻¹) do óleo essencial diluído em metanol. As análises foram realizadas em triplicata.

As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro UV/Visível, modelo Genesys™, em comprimento de onda de 517 nm. A leitura da absorvância dos tubos contendo DPPH ocorreu 60 minutos após o início da reação, durante este período as amostras foram colocadas em ambiente escuro à temperatura ambiente, para obtenção de valores estáveis da absorvância.

A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade dos óleos essenciais em sequestrar o radical DPPH e a determinação quantitativa do método baseou-se na variação da absorbância obtida por uma perda da cor da solução do radical na presença de substâncias antioxidantes presente na amostra de óleo. O DPPH é um radical livre, estável em temperatura ambiente, que produz uma solução violeta em metanol. Na presença de componentes antioxidantes, o DPPH é reduzido, produzindo uma solução metanólica transparente (Figura 6).

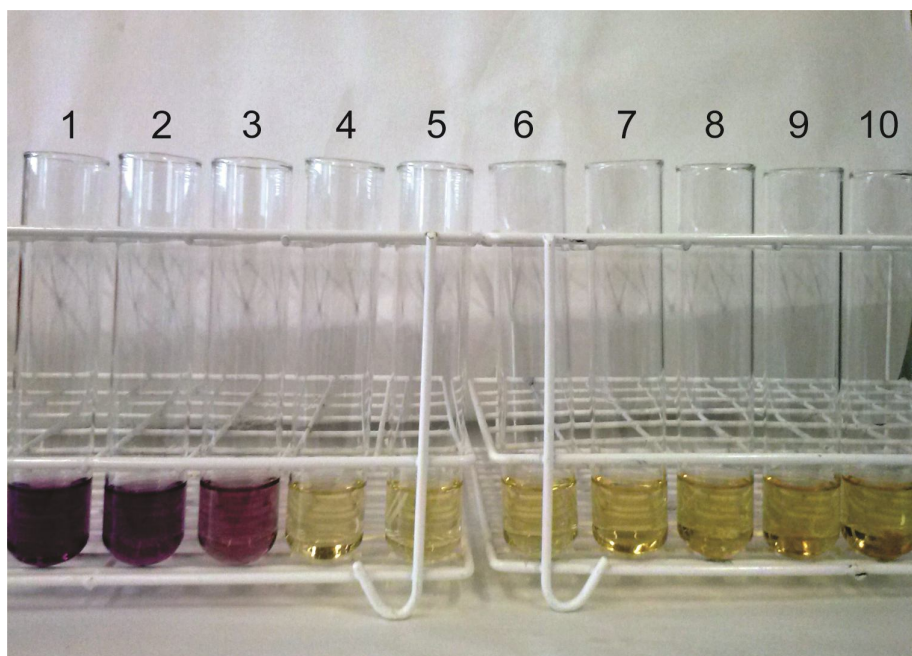


FIGURA 6. Atividade antioxidante DPPH, 1= controle (metanol+DPPH); 2 a 10 concentrações do óleo essencial em ordem crescente (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 10 e 25 mg mL⁻¹)

Para cada concentração ensaiada em triplicata foi calculada a média e o desvio padrão das absorbâncias medidas, utilizando o programa Excel 2010. Com a média das absorbâncias foi calculada a porcentagem de inibição do radical DPPH (que corresponde à quantidade de DPPH sequestrado) conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ de efeito de eliminação} = [(ADPPH-AS)/ADPPH] \times 100, \text{ onde:}$$

As é a absorvância da solução com a amostra e ADPPH é a absorvância da solução de DPPH.

Ainda com o auxílio do programa Excel 2010, foram traçados gráficos correlacionando-se a porcentagem de DPPH sequestrado e as concentrações testadas de cada óleo, com objetivo de calcular o índice capaz de inibir 50% dos radicais livres (CE_{50}).

6.2. Determinação do poder redutor

Para a determinação do poder redutor foi seguida a metodologia descrita por Berker et al., (2007). Assim, utilizou-se 1 mL das concentrações do óleo essencial (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 10 e 25 mg mL⁻¹) de cada amostra e colocou-se num tubo de ensaio, no qual também foi adicionado 2,5 mL de tampão fosfato a 0,2M (pH= 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1%. Em seguida a mistura foi incubada a 50°C durante 20 minutos e posteriormente deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Após o arrefecimento adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% e os tubos foram agitados vigorosamente no aparelho Vortex. Em seguida foi retirado da solução 2,5 mL do sobrenadante e acrescentou-se 2,5 mL de água destilada, mais 0,5 mL de cloreto férrico a 1% e esperou-se 2 minutos para ler as absorvâncias espectrofotometricamente a 700nm.

Para cada concentração ensaiada em triplicata foi calculada a média e o desvio padrão das absorvâncias medidas, utilizando o programa Excel 2010. A partir dos dados da absorvância registrada a 700 nm e da concentração do óleo essencial foi possível gerar os gráficos e correlacionar os valores correspondente a 0,5 da absorvância que indica o índice capaz de inibir 50% dos radicais livres (CE_{50}).

Durante a redução do Íon de ferro³⁺ para ferro²⁺ na presença de compostos antioxidante ocorre uma variação da coloração verde intenso para um amarelo claro (Figura 7).

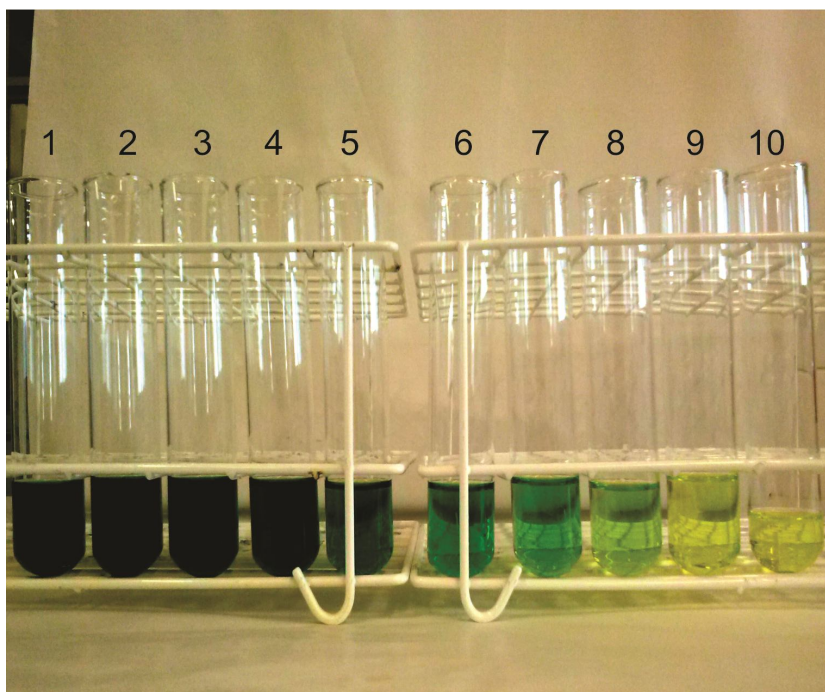


FIGURA 7. Atividade antioxidante Poder Redutor, 1= controle (metanol+reagentes utilizados no método); 2 a 10 concentrações do óleo essencial em ordem crescente (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 10 e 25 mg mL⁻¹)

6.3 Atividade Sequestradora do Radical ABTS (ABTS⁺)

A formação do radical ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] é a base de um dos métodos espectrofotométricos que tem sido aplicado para a medição da atividade antioxidante total das soluções de substâncias puras, misturas aquosas e bebidas. Este método permite medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. O método foi descrito por Re et al. (1999), com base na capacidade de uma amostra em inibir o radical ABTS (ABTS⁺) em comparação com um padrão de referência antioxidante (Trolox). A reação química do ABTS⁺ com persulfato de potássio (K₂S₂O₈), permite a formação dos radicais ABTS.

Assim, para esta técnica, o ABTS⁺ (7mM) foi enriquecido com K₂S₂O₈ (140mM), deixando-se repousar no escuro à temperatura ambiente entre 12 a 16 horas. A solução de trabalho foi preparada com etanol até à obtenção de uma

absorbância a $\lambda = 734 \text{ nm}$ de $0,70 \pm 0,02$. A reação realizou-se diretamente na cuvete de quartzo, com a adição de 2 mL de ABTS+ (Branco) e de 100 μL de amostra ou padrão. Os valores de absorbância são inversamente proporcionais à quantidade de antioxidantes presentes nas amostras.

Após o preparo da ABTS, foi utilizado 2,7 mL da solução em tubos de ensaio contendo 300 μL de cada concentração previamente preparada (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 10 e 25 mg mL^{-1}) do óleo essencial. As análises foram realizadas em triplicata.

As medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV/Visível, modelo Genesys™, em um comprimento de onda de 734 nm. A leitura da absorbância das amostras foi realizada logo após a adição da ABTS.

ABTS produz uma solução azul e na presença de compostos antioxidante, é reduzido, produzindo uma solução metanólica transparente (Figura 8).

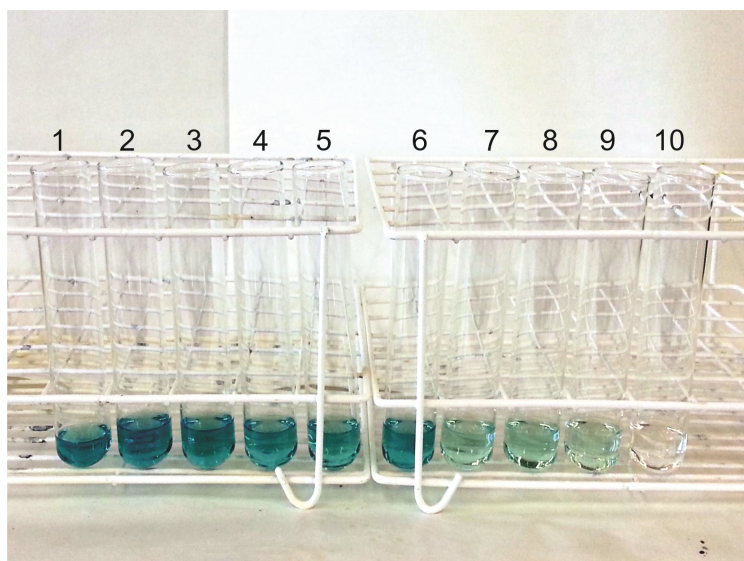


FIGURA 8. Atividade antioxidante ABTS, 1= controle (metanol+ABTS); 2 a 10 concentrações do óleo essencial em ordem crescente (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5, 10 e 25 mg mL^{-1})

Para cada concentração ensaiada em triplicata foi calculada a média e o desvio padrão das absorbâncias medidas, utilizando o programa Excel 2010. Com a média das absorbâncias foi calculado a porcentagem de inibição do radical ABTS conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ de efeito de eliminação} = [(ABTS - AS) / ABTS] \times 100, \text{ onde:}$$

As é a absorbância da solução com a amostra e ABTS é a absorbância da solução de ABTS.

Ainda com o auxílio do Excel 2010, foram traçados gráficos correlacionando a % de ABTS sequestrado e as concentrações testadas de cada óleo, com objetivo de calcular o índice capaz de inibir 50% dos radicais livres (CE_{50}).

7. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000). As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância pelo teste de F e aplicado o teste de Turkey ($P < 0,05$).

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada usando o software SPSS, versão 19.0 (IBM Corporation, Nova Iorque, E.U.A.). Esta técnica quimiométrica foi aplicada para reduzir o número de variáveis (27 variáveis correspondentes aos compostos dos óleos essenciais identificados e valores de CE_{50} obtidos nos métodos do DPPH, poder redutor e ABTS) a um número inferior de novas variáveis derivadas (componentes principais ou fatores) que sumarizam adequadamente a informação original, ou seja, o perfil dos compostos químicos e atividade antioxidante de doze amostras de óleo essencial de *Lippia origanoides*.

O número de fatores a ser mantido no tratamento dos dados foi avaliado pelo *Screen plot*, tomando em consideração os *eigenvalues* e a consistência interna através do valor do α -Cronbach's (RENCHER, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides*

Foram identificados 27 compostos do óleo essencial das folhas de *Lippia origanoides*, divididos entre monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 3). Os sesquiterpenos são, em geral, menos voláteis que os monoterpenos, mas podem influenciar sensivelmente no odor dos óleos onde ocorrem (LOAYZA et al., 1995).

TABELA 3. Componentes químicos identificados e seus respectivos índices de Kovats calculados (IK_C), índices de Kovats da literatura (IK_L), variação dos dados do menor e maior valor entre os tratamentos e médias de suas concentrações dos óleos essenciais das plantas de *Lippia origanoides* H.B.K Feira de Santana-BA, 2012.

| Compostos | IK_{calc} | IK_{lit} | Variação dos dados (%) | Media geral (%) |
|------------------------|-------------|------------|------------------------|-----------------|
| pent-4-enoato de etila | 884 | 888 | 0,10-0,30 | 0,2 |
| α-tujeno | 930 | 930 | 0,5-1,47 | 0,8 |
| α -pineno | 938 | 939 | 0,10-0,70 | 0,4 |
| canfeno | 954 | 954 | 0,33-2,0 | 0,9 |
| 1-octen-3-ol | 980 | 979 | tr-0,10 | 0,1 |
| mirreno | 992 | 990 | 0,90-1,67 | 1,2 |
| α -terpineno | 1019 | 1020 | 0,63-1,47 | 1,0 |
| ρ- cimeno | 1028 | 1024 | 4,33-11,07 | 6,5 |
| limoneno | 1032 | 1029 | 0,20-0,50 | 0,3 |
| γ -terpineno | 1063 | 1064 | 3,83-9,0 | 5,9 |
| linalol | 1100 | 1196 | 2,53-15,87 | 8,7 |
| cânfora | 1148 | 1146 | 0,93-2,90 | 2,0 |
| borneol | 1169 | 1169 | 0,53-1,43 | 0,8 |
| terpinen-4-ol | 1180 | 1177 | 0,43-0,57 | 0,5 |
| metil timil eter | 1238 | 1235 | 2,07-2,87 | 2,5 |
| timol | 1296 | 1290 | 2,30-4,10 | 3,1 |
| carvacrol | 1311 | 1299 | 33,23-58,60 | 45,7 |
| acetato de carvacrol | 1376 | 1372 | 0,30-0,63 | 0,5 |
| E-cariofileno | 1423 | 1419 | 3,97-5,20 | 4,7 |
| α-bergamoteno | 1438 | 1434 | 0,20-0,47 | 0,4 |
| aromadendreno | 1442 | 1441 | 0,67-0,93 | 0,8 |
| α-humuleno | 1457 | 1454 | 1,20-1,67 | 1,5 |
| biciclogermacreno | 1500 | 1500 | 3,23-8,50 | 5,8 |
| 7-epi- α-selineno | 1521 | 1522 | 0,23-0,43 | 0,4 |
| espatulenol | 1581 | 1578 | 1,73-3,23 | 2,3 |
| óxido de cariofileno | 1586 | 1583 | 0,80-1,60 | 1,2 |
| viridiflorol | 1594 | 1592 | 0,13-0,40 | 0,3 |
| Total identificado | | | | 98,30 |

Com base na tabela 3, pode-se observar que os compostos carvacrol (45,7%), linalol (8,7%), *p*-cimeno (6,5%), γ -terpineno (5,9%), (E)-cariofileno (4,72%) e timol (3,1%) foram os componentes majoritários do óleo essencial de *Lippia origanoides* (Figura 9).

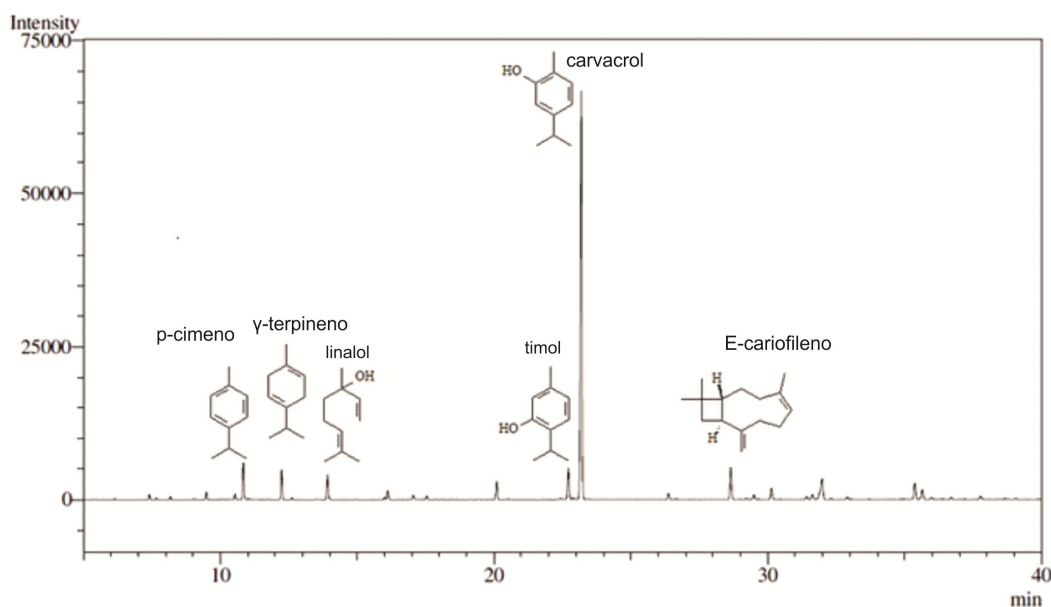


FIGURA 9. Cromatograma obtido do óleo essencial da primeira colheita de plantas adubadas com adubo mineral.

Silva (2012) estudando o efeito de biorreguladores sobre o crescimento e teor de óleo nessa mesma espécie, na região de Feira de Santana-BA, também encontrou como componentes majoritários o carvacrol (46,39%), seguido do γ -terpineno (9,99%), *p*-cimeno (8,15%), (E)-cariofileno (4,72%), biciclogermacreno (4,73%) e timol (3,80%). Verbel et al. (2010) na Colômbia, identificaram o *p*-cimeno (15,7%), o *trans*- β -cariofileno (9,4%) e α -terpineno em maiores concentrações nas amostra de óleo de *Lippia origanoides*. Cavalcante et al. (2009) no estado do Piauí obtiveram em maior concentração o carvacrol, correspondendo a 43,96% do óleo, o 1,8-cineol com 22,75%, o γ -terpineno com 8,87%, metil timol com 7,08% e acetato de carvacrol com 4,60% e Oliveira et al. (2007) em estudo feito o Pará, constataram a ocorrência de carvacrol como composto majoritário (38,6%), porém, o composto com segunda maior concentração foi o timol (18,5%), seguido pelo *p*-cimeno (10,3%) e pelo γ -terpineno (4,1%).

Os diferentes compostos majoritários identificados na espécie *Lippia origanoides* permitem identificar os diferentes quimiotipos para essa espécie. A partir dos resultados obtidos nos trabalhos citados acima, observa-se que o carvacrol foi o composto majoritário encontrado nos diferentes estados do Brasil. Já os estudos feito na Colômbia por Stashenko et al. (2010) foi possível identificar três grupos da espécie através dos componentes majoritários presente no óleo essencial. O α e β phellandreno, ρ -cimeno, e limoneno como compostos majoritários do quimiotipo A, o carvacrol e timol representando o quimiotipo B e C, respectivamente. Escobar et al. (2010) analisando diferentes amostras de *Lippia origanoides* constataram variabilidade na composição dos terpenos majoritários, identificando o ρ -cimeno (11,2-15,7%), γ -terpineno (1,5 –13,2%), timol (0–53,6%) e carvacrol (0–46,2%) como majoritários. Os autores obtiveram dois grupos distintos de quimiotipos, um composto pela elevada concentração de timol e um segundo grupo com carvacrol. Tais resultados permitem inferir à existência de quimiotipos para a espécie. O linalol, um dos compostos identificado neste trabalho como majoritário, não foi encontrado em maior quantidade nos estudos citados acima para a mesma espécie, portanto, as condições de cultivo em que a planta foi submetida podem ter favorecido a síntese elevada do linalol.

A análise de variância para a concentração dos seis componentes majoritários revelou que houve interação significativa entre os fatores de variação estudados para γ -terpineno, linalol, timol e carvacrol ($p < 0,05$). Para os componentes ρ -cimeno e biciclogermacreno, apenas a época de colheita promoveu diferenças significativas entre as concentrações ($p < 0,05$). Já para o (E)-cariofileno, tanto o tipo de adubação quanto as épocas de colheita não promoveram efeito sobre sua concentração ($p > 0,05$) (Tabela 4).

TABELA 4: Análise de Variância dos sete principais componentes majoritários do óleo essencial de folhas e inflorescências de plantas cultivadas de *Lippia origanoides* H.B.K, em função da época de colheita e adubação. Feira de Santana-Bahia, 2012.

| Variáveis | Fatores | Grau de Liberdade | Valor-F | Significância | P |
|-------------------|---------------|-------------------|---------|---------------|----|
| γ -terpineno | Adubação (AD) | 2 | 0,333 | 0,734 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 15,397 | 0,003 | ** |
| | (AD x EP) | 6 | 3,062 | 0,046 | ** |
| ρ - cimeno | Adubação (AD) | 2 | 0,152 | 0,863 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 6,171 | 0,029 | ** |
| | (AD x EP) | 6 | 1,928 | 0,156 | ns |
| linalol | Adubação (AD) | 2 | 2,009 | 0,248 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 74,275 | 0,000 | ** |
| | (AD x EP) | 6 | 3,144 | 0,043 | ** |
| timol | Adubação (AD) | 2 | 0,522 | 0,628 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 44,945 | 0,000 | ** |
| | (AD x EP) | 6 | 3,419 | 0,033 | ** |
| carvacrol | Adubação (AD) | 2 | 0,036 | 0,964 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 30,550 | 0,000 | ** |
| | (AD x EP) | 6 | 2,952 | 0,05 | ** |
| (E)-cariofileno | Adubação (AD) | 2 | 0,097 | 0,909 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 1,550 | 0,296 | ns |
| | (AD x EP) | 6 | 1,277 | 0,337 | ns |
| biciclogermacreno | Adubação (AD) | 2 | 0,415 | 0,685 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 18,554 | 0,001 | ** |
| | (AD x EP) | 6 | 0,680 | 0,668 | ns |

ns= não significativo ($P < 0,05$); ** significativo a 5% de probabilidade

Os compostos biciclogermacreno e (E)-cariofileno apresentaram o mesmo comportamento frente às épocas de colheita, não diferenciando suas concentrações da primeira a quarta época (Tabela 5). Em contrapartida, verificou-se um aumento das concentrações do linalol e redução do carvacrol ao longo tempo. Botrel et al. (2010) relataram que a redução na concentração dos compostos pode estar relacionada com o ciclo fisiológico da planta, onde períodos mais frios acarreta a baixa atividade biossintética, concordando com o resultado encontrado neste trabalho para o carvacrol. Assim, essas variações quantitativas na composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides* podem ser atribuídas aos fatores ambientais que podem estimular os mecanismos de

controle da rota biossintética, promovendo a produção de determinados constituintes terpenóidicos (BARROS; ZAMBARDA; HEINZMANN, 2009). Resultados encontrados por Silva et al. (2009), demonstraram variabilidade nos componentes majoritários de *L. microphylla*, em plantas coletadas em horários distintos, onde as concentrações de timol foram elevadas, variando de 53,23% e 56,01% entre 8 e 18 horas, enquanto o carvacrol nestes horários foram inferiores a 1%, entretanto, no horário de 12 horas o timol passou a ter concentração de 5,33% e o carvacrol tornou-se o componente majoritário com 42,88%. Oliveira et al. (2011) observaram em *Lippia origanoides* cultivadas em Manaus-AM, em diferentes estações do ano, que maiores concentrações dos compostos carvacrol (48,8%) e timol (9,4%) foram observadas no inverno, enquanto que no verão estes valores foram reduzidos para 39,2% e 6,5%, respectivamente.

TABELA 5: Concentração dos sete principais componentes majoritários do óleo essencial de folhas e inflorescências de plantas cultivadas de *Lippia origanoides* H.B.K em função da época de colheita e tipo de adubação Feira de Santana-BA,2012.

| Variáveis | Adubação | Época de colheita | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|-----------|----------|
| | | Janeiro | Abril | Julho | Outubro |
| p -cimeno | Controle | 6,27 ABa | 5,53 Aa | 6,53 Aa | 7,60 Aa |
| | Adubação orgânica | 5,93 Ba | 6,50 Aa | 4,33 Aa | 7,83 Aa |
| | Adubação mineral | 11,07Aa | 5,23 Ab | 5,20 Ab | 5,93 Aab |
| γ -terpineno | Controle | 3,97 Ab | 4,07 Ab | 8,40 Aa | 9,00 Aa |
| | Adubação orgânica | 4,47 Aa | 5,43 Aa | 4,70 Ba | 8,03 Aa |
| | Adubação mineral | 7,00 Aa | 3,83 Aa | 4,93ABa | 6,50 Aa |
| linalol | Controle | 2,53 Ac | 5,97 Ac | 12,50 Aa | 11,37 Aa |
| | Adubação orgânica | 2,73 Ac | 4,57 Ac | 12,13 Ab | 15,87 Aa |
| | Adubação mineral | 3,07 Ab | 5,67 Ab | 13,53 Aa | 14,30 Aa |
| timol | Controle | 4,10 Aa | 3,00 Ab | 2,47 Bb | 2,47 Ab |
| | Adubação orgânica | 4,03 Aa | 3,23 Ab | 3,10 Ab | 2,30 Ac |
| | Adubação mineral | 3,50 Aa | 3,43 Aa | 3,00 ABab | 2,63 Ab |
| carvacrol | Controle | 58,60 Aa | 50,17 Aa | 39,17 Ab | 35,43 Ab |
| | Adubação orgânica | 56,53 Aa | 50,50 Aab | 43,83 Ab | 33,23 Ac |
| | Adubação mineral | 47,20 Bab | 51,37 Aa | 43,30 Aab | 39,37 Ab |
| (E)-cariofileno | Controle | 4,13 Aa | 4,80 Aa | 4,50 Aa | 5,20 Aa |
| | Adubação orgânica | 4,73 Aa | 4,97 Aa | 5,33 Aa | 3,97 Aa |
| | Adubação mineral | 4,80 Aa | 5,13 Aa | 4,83 Aa | 4,27 Aa |
| bicyclogermacreno | Controle | 3,23 Ab | 6,07 Aab | 6,80 Aab | 7,33 Aa |
| | Adubação orgânica | 4,00 Ab | 5,97 Aab | 8,50 Aa | 5,57 Aab |
| | Adubação mineral | 3,43 Aa | 5,83 Aa | 6,90 Aa | 6,07 Aa |

Médias seguidas da mesma letra na coluna (maiúscula) e na linha (minúscula) não difere significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey .

Os compostos ρ -cimeno, timol e linalol tiveram suas concentrações aumentadas com o uso dos adubos na primeira, terceira e quarta colheita, respectivamente (Tabela 5). Apesar dos resultados obtidos com adubação mineral não terem se diferenciado estatisticamente dos obtidos no controle, verificou-se um aumento de 43,36% do ρ -cimeno na primeira colheita; o timol aumentou em 20% na terceira colheita pela influência da adubação orgânica; e o linalol em torno de 20% independente do adubo utilizado. Resultados contrários foram obtidos na terceira colheita, com o γ -terpineno, onde foi observada redução de 44% da concentração no tratamento com adubação orgânica. Já o carvacrol reduziu em 19,45% na primeira colheita na presença do adubo mineral. Os compostos biciclogermacreno e (E)-cariofileno não foram influenciados pelo tipo de adubação. Gama (2011) em estudo com *Lippia alba* verificou que os diferentes compostos orgânicos proporcionaram aumento nas concentrações dos principais compostos dessa espécie (carvona, limoneno e germacreno D). Já Corrêa et al. (2010) obtiveram efeitos negativos com esterco bovino e avícola na produção de timol em *Origanum vulgare* L., em contrapartida Silva et al. (2006), avaliando diferentes doses de esterco bovino em *Baccharis trimera* não observaram efeito sobre os principais compostos da espécie. As variações observadas nos resultados obtidos para cada amostra, e os resultados encontrados pelos autores citados acima, são indicativos de que a síntese dos diferentes compostos químicos é influenciada por vários fatores de ordem climática, sazonal, geográfica, período de colheita e condições edáficas e nutricionais (BAYDAR et al., 2004).

Os diferentes tipos de adubos e épocas de colheita não influenciaram a constituição química da *Lippia origanoides*, promovendo somente variações quantitativas segundo os diferentes tratamentos aplicados. A presença do carvacrol, ρ -cimeno e timol, conferem a esta espécie o uso medicinal e atividades biológicas comprovadas contra micro-organismos patogênicos (HYLDGAARD et al., 2012). O linalol, segundo composto encontrado em maior concentração no óleo essencial dessa espécie é largamente utilizado na indústria de alimentos, cosméticos e perfumes, e também possui propriedades acaricida, bactericida e fungicida, além de ser aplicado com sucesso como sedativo e anticonvulsivo. Na Europa, o linalol foi incluído na lista de substâncias classe "A", graças a sua importância como matéria-prima para

síntese de compostos de alto valor agregado (LETIZIA et al., 2003; ALCÂNTARA et al., 2010).

2. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante do óleo essencial das folhas+inflorescência de *Lippia origanoides* foi avaliada por três ensaios químicos diferentes: Poder Redutor, captura dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil-DPPH e 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)-ABTS, sendo os resultados obtidos expressos como valores de CE_{50} (mg mL⁻¹). A análise de variância para os três métodos da atividade antioxidante revelou que houve interação significativa entre os fatores de variação época de colheita e adubação ($p < 0,05$) para o DPPH e ABTS. Para o Poder Redutor não houve efeito significativo em nenhuma das variáveis analisadas ($p < 0,05$) (Tabela 6).

TABELA 6. Análise de Variância dos métodos antioxidante (Poder Redutor, DPPH e ABTS) do óleo essencial de folhas + inflorescências de plantas cultivadas de *Lippia origanoides* H.B K, em função da época de colheita e adubação.

| Variáveis | Fatores | Grau de Liberdade | Valor-F | Significância | P |
|---------------|---------------|-------------------|---------|---------------|----|
| Poder Redutor | Adubação (AD) | 2 | 0,477 | 0,651 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 1,889 | 0,232 | ns |
| | (AD x EP) | 6 | 1,074 | 0,429 | ns |
| DPPH | Adubação (AD) | 2 | 2,339 | 0,212 | ns |
| | Época (EP) | 3 | 95,339 | 0,000 | ** |
| | (ADXEP) | 6 | 19,482 | 0,000 | ** |
| ABTS | Adubação (AD) | 2 | 157,866 | 0,000 | ** |
| | Época (EP) | 3 | 438,579 | 0,000 | ** |
| | (ADXEP) | 6 | 122,090 | 0,000 | ** |

ns= não significativo ($P < 0,05$); ** = significativo a 5 % de probabilidade

As três metodologias analisadas apresentaram resultados positivos em relação à atividade antioxidante do óleo essencial da *Lippia origanoides*. Foi possível identificar em cada um dos métodos a quantidade necessária do óleo

para reduzir inicialmente 50% (CE_{50}) dos radicais livres presentes nas amostras.

O ensaio químico Poder Redutor permitiu observar que o óleo essencial de *Lippia origanoides* possui compostos com capacidade redutora, no qual pode-se indicar seu potencial antioxidante. Neste método, os valores do CE_{50} variaram entre $1,87 \pm 0,26$ e $2,23 \pm 0,28$ $mg mL^{-1}$.

Tanto para o tratamento com adubação quanto para as épocas de colheita não houve diferença estatística, não sendo possível para este método fazer qualquer tipo de comparação entre eles (Figura 10). Estudos com óleo essencial de *Artemisia annua* Cavar et al. (2012) indicaram CE_{50} correspondente a $127,17$ $mg mL^{-1}$, valor superior ao encontrado no presente trabalho, o que mostra uma maior capacidade redutora da *Lippia origanoides* em reduzir os íons de ferro, quando comparada a *A.annua*.

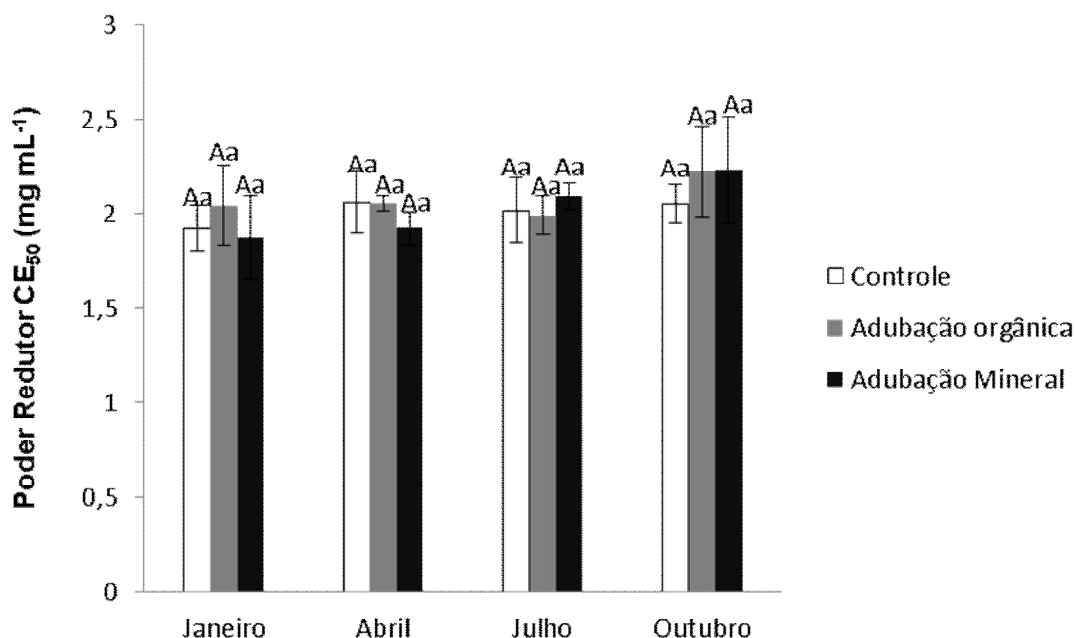


FIGURA 10 – Valores médios do CE_{50} ($mg mL^{-1}$) do método Poder Redutor, obtidos do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K em função da época de colheita e tipo de adubação. A letra minúscula na coluna compara os tratamentos com adubação dentro do mês e a letra maiúscula comparam os tratamentos com adubação ao longo dos meses. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Apesar dos valores encontrados no presente estudo terem sido próximos, não diferenciando entre si, o óleo essencial dessa espécie apresentou

capacidade em reduzir os íons de ferro Fe^{3+} a Fe^{2+} , inibindo a formação do complexo ferroso e ferrozina.

Em relação ao efeito bloqueador de radicais livres DPPH, verificou-se diferenças significativas entre os tratamentos com adubação e entre as épocas de colheita ($P < 0,05$) (Figura 11). O valor da Concentração Eficaz (CE_{50}) foi mais elevado na amostra proveniente do cultivo com adubação mineral e orgânica (2,32 e 2,08 mg mL^{-1}) colhidas nos meses de julho e outubro, respectivamente. Contudo, a amostra do tratamento controle, colhida no mês de Janeiro apresentou o menor valor CE_{50} (0,46 mg mL^{-1}), o mesmo ocorreu ao tratamento com adubação orgânica, que apresentou valor mais baixo neste mesmo período (0,70 mg mL^{-1}) (Figura 11). Os valores de CE_{50} no tratamento com adubação mineral não diferiram entre si nos meses de janeiro (1,20 mg mL^{-1}), abril (1,27 mg mL^{-1}) e outubro (1,47 mg mL^{-1}).

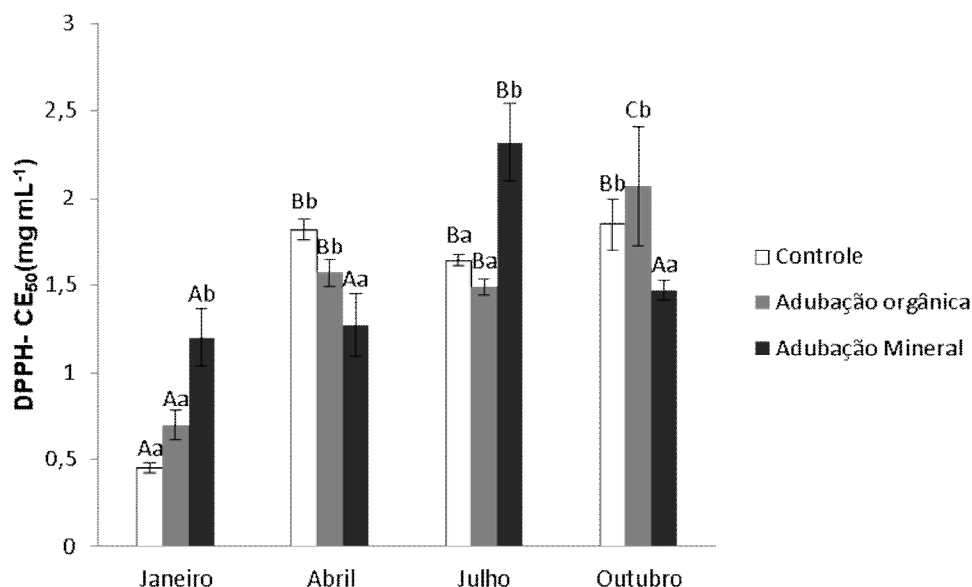


FIGURA 11 – Valores médios do CE_{50} (mg mL^{-1}) do método DPPH, obtidos do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K em função da época de colheita e tipo de adubação. A letra minúscula na coluna compara os tratamentos com adubação dentro do mês e a letra maiúscula compararam os tratamentos com adubação ao longo dos meses. Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

O CE_{50} obtido de amostras dos tratamentos com adubação e das diferentes épocas de colheita no método DPPH variaram entre 0,46 mg mL^{-1} a 2,32

mg.mL⁻¹, onde os menores valores encontrados indicam um maior potencial da amostra de óleo em inibir os radicais livres. Neste método foi possível obter uma correlação negativa ($r=-0,650$, $p=0,000$) entre o teor de carvacrol e a atividade antioxidante, observando que as menores concentrações para inibição dos radicais livres foram identificadas nas amostras que obtiveram maiores porcentagens de carvacrol (Tabela 3).

Para os métodos Poder Redutor e ABTS não foram observados correlações significativas (Tabela 7).

TABELA 7. Correlação de Pearson (r) dos métodos de atividade antioxidante e o teor de carvacrol do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K.

| Método antioxidante | Carvacrol CE ₅₀ |
|-----------------------|----------------------------|
| DPPH CE ₅₀ | -0,650** |
| PR CE ₅₀ | -0,114 ^{ns} |
| ABTS CE ₅₀ | 0,139 ^{ns} |

n.s.=correlação não significativa; ** significativo a 5% de probabilidade

A ação dos óleos essenciais em neutralizar radicais livres está associada a sua composição química (DAMIAN, 2011). Cabe salientar que os resultados obtidos para atividade antioxidante, podem estar relacionados, pelo menos em parte, com a presença do carvacrol apresentado na Tabela 3. Assim, as amostras que obtiveram um maior teor de carvacrol, revelaram um maior potencial antioxidante, paralelamente, às amostras que foram observadas um menor teor em carvacrol, conseqüentemente apresentaram atividade antioxidante inferior.

Bedoya et al. (2012), em estudo com óleo essencial de *Lippia origanoides* avaliando dois métodos da atividade antioxidante (DPPH e ABTS), encontraram valores da capacidade antioxidante de 5,58 mg mL⁻¹ para DPPH e 1,0 mg mL⁻¹ para ABTS; os autores atribuem a inibição dos radicais principalmente a alta porcentagem de timol (73%). Os valores de DPPH encontrados pelos autores citados acima (5,58 mg mL⁻¹), ainda são superiores ao maior registro encontrado neste trabalho (2,32 mg mL⁻¹), provavelmente devido ao perfil químico das amostras, onde no presente trabalho foi encontrado o carvacrol em maior quantidade. Em trabalho realizado por Verbel et al.(2010) com a mesma espécie na Colômbia, avaliando atividade

antioxidante por meio do método deoxirribose, sendo esta metodologia semelhante ao DPPH, pois medem a inibição do radical livre pelo antioxidante presente na amostra, os autores encontraram a concentração eficaz CE_{50} de $(463,5 \mu\text{g mL}^{-1})$ e ρ -cimeno (15,7%) como elemento majoritário. Stashenko et al., (2003) em *Lippia alba* (quimiotipo carvona), *Lippia alba* (quimiotipo citral) identificaram valores de CE_{50} de 289 e 305 mg mL^{-1} através do método DPPH, respectivamente. Tais resultados permitem inferir que existe diferença entre a capacidade antioxidante do óleo essencial e os diferentes quimiotipos dentro da mesma espécie.

No ensaio pelo método ABTS, onde o cátion radical $ABTS^+$ formado com uma reação com o persulfato de potássio é reduzido pela ação de um antioxidante, podendo o antioxidante ser lipofílico e/ou hidrofílico (RUFINO et al., 2007), foi possível observar interação significativa entre as épocas de colheita e tipo de adubação, onde o valor de CE_{50} apresentou menor valor $(0,13 \text{ mg mL}^{-1})$ nos óleos obtidos das plantas com adubação orgânica, no mês de janeiro e o maior valor de CE_{50} foi observado no tratamento com adubação mineral, no mês de abril $(2,03 \text{ mg mL}^{-1})$. Para o tratamento controle, sem adubação, os melhores resultados foram obtidos nos meses janeiro $(0,29 \text{ mg mL}^{-1})$, abril $(0,21 \text{ mg mL}^{-1})$ e julho $(0,22 \text{ mg mL}^{-1})$. Já para adubação orgânica foram os meses de janeiro $(0,13 \text{ mg mL}^{-1})$ e julho $(0,24 \text{ mg mL}^{-1})$ e para adubação mineral os melhores resultados foram nos meses de janeiro $(0,25 \text{ mg mL}^{-1})$, julho $(0,36 \text{ mg mL}^{-1})$ e outubro $(0,49 \text{ mg mL}^{-1})$ (Figura 11). Os dados variaram entre 0,13 a $2,03 \text{ mg mL}^{-1}$, onde os menores valores encontrados de CE_{50} entre os tratamentos, indicaram maior potencial antioxidante.

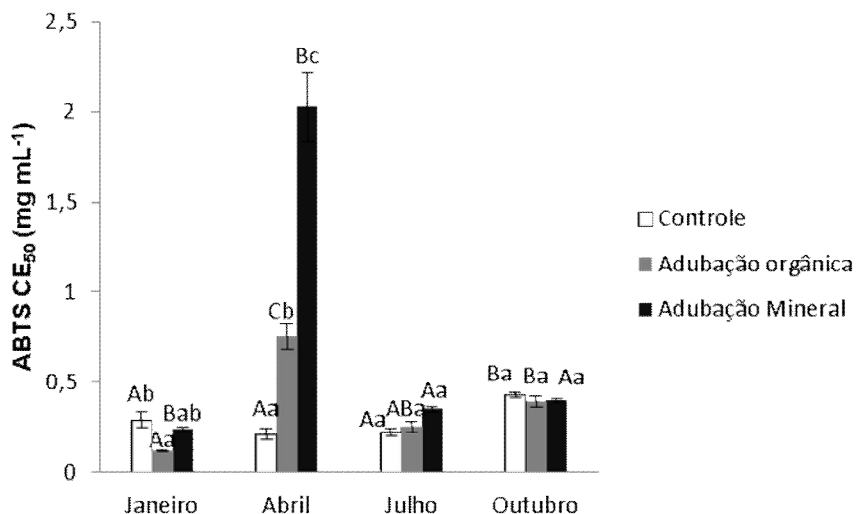


FIGURA 12– Valores médios do CE_{50} ($mg mL^{-1}$) do método ABTS, obtidos do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K em função da época de colheita e tipos de adubação. A letra minúscula na coluna compara os tratamentos com adubação dentro do mês e a letra maiúscula comparam os tratamentos com adubação ao longo dos meses. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os resultados obtidos pelos diferentes métodos não são comparáveis devido a vários fatores como a estrutura física do sistema, a natureza do substrato, a presença de compostos que podem interagir como iniciar a oxidação, e o método para medir a oxidação (FRANKEL e MEYER, 2000; BECKER, et al., 2004). A exemplo do radical $ABTS^+$ que é mais sensível do que o radical $DPPH^+$, enquanto que este último envolve transferência de hidrogênio, a reação com o radical $ABTS^+$ está relacionada à transferência de elétrons (TUBA e GÜLÇİN, 2008).

Em geral, a eficácia antioxidante do óleo essencial depende do conteúdo de compostos fenólicos. Esse grupo de metabólitos pode agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, ou mesmo na quelação de metais (GUIMARAES et al., 2010).

Estudos com outras espécies revelaram resultados promissores para o uso do óleo essencial dessas plantas como inibidor dos radicais livres. Damian (2011), avaliando *Eucalyptus badiensis* encontrou CE_{50} de $0,57 mg mL^{-1}$; Malinowski (2010) observou em *E. globulus ssp. bicostata* o valor do CE_{50} de $6 mg mL^{-1}$. Silvestri et.al. (2010) observaram uma alta correlação positiva entre a

concentração de eugenol e atividade antioxidante do cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) com CE_{50} de $1,118 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sherer et. al. (2009) também observaram o potencial antioxidante em três espécies medicinais: *Caryophyllus aromaticus* L., *Cymbopogon winterianus* e *Cymbopogon martinii*. O óleo essencial de *Caryophyllus aromaticus* L, apresentou ação forte, pelo baixo valor do CE_{50} $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ encontrado na amostra. Contudo, as outras espécies, *Cymbopogon winterianus* apresentaram alto valor de CE_{50} $743 \mu\text{g mL}^{-1}$ e *Cymbopogon martinii* mesmo na maior concentração avaliada, não foi capaz de reduzir o DPPH.

3. Análise do Componente Principal-ACP

De modo a resumir toda a informação obtida no perfil dos compostos presentes nos óleos essenciais e na atividade antioxidante de *Lippia origanoides*, foi aplicada uma análise de componentes principais (ACP) aos dados obtidos. Com a aplicação desta técnica quimiométrica, com o uso de apenas dois componentes principais, foi possível explicar 56% da variabilidade observada nos dados (35,50% na primeira dimensão e 20,33% na segunda dimensão) (Figura 13).

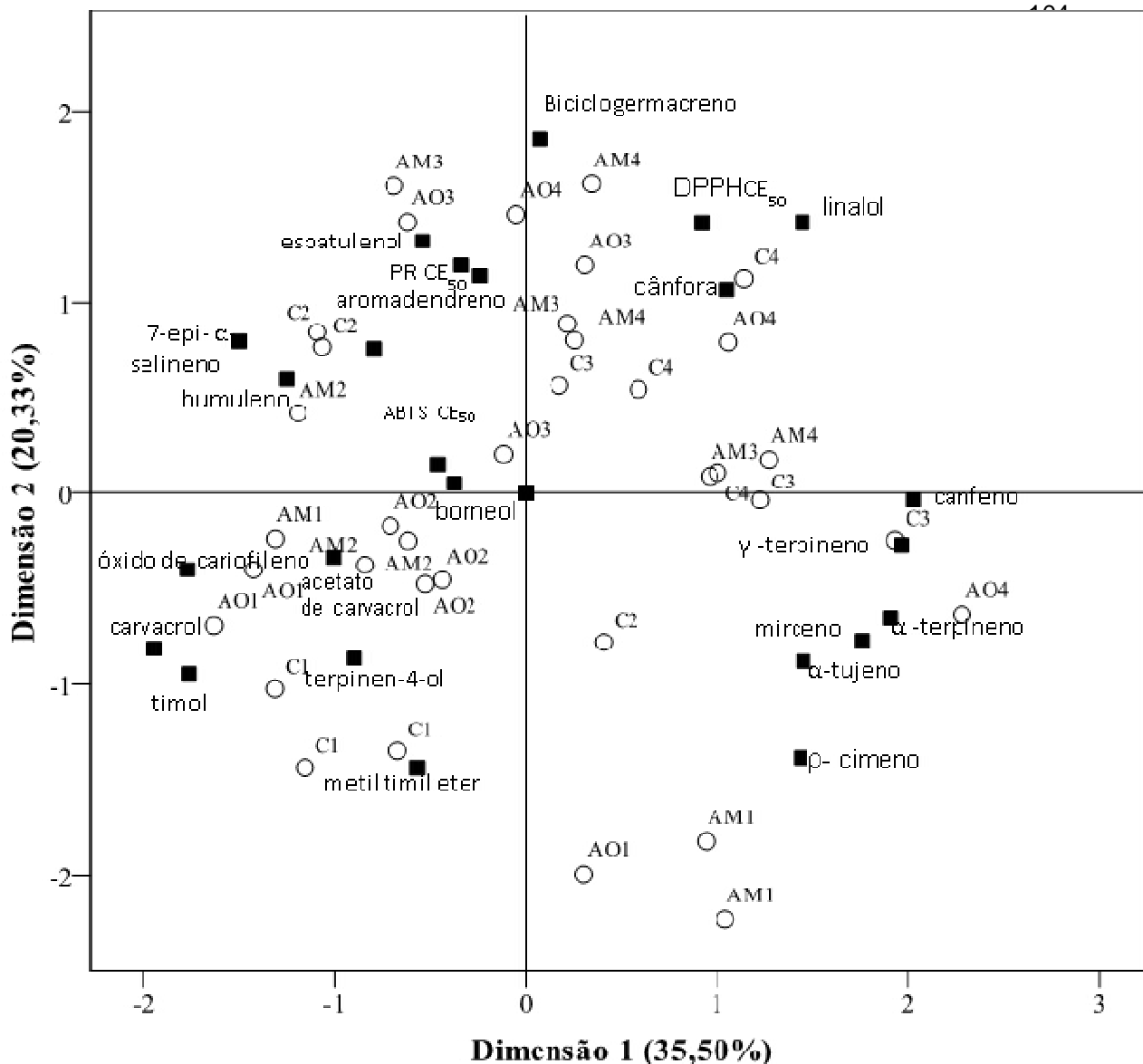


FIGURA 13. Análise de componentes principais-ACP usando a composição química e os valores de CE_{50} obtidos da atividade antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K ACP explica 56% da variância total dos dados.

Nas regiões positivas das duas dimensões (Ou o componente principal 1 e 2; CP1 e CP2) são representados principalmente pelas amostras da terceira e quarta colheita submetidas a adubação mineral e do tratamento controle. Isso acontece porque essas amostras apresentaram maiores concentrações dos compostos canfeno, linalol, cânfora e biciclogermacreno. A maioria das amostras da primeira e segunda colheita, tanto da adubação mineral, adubação orgânica e do controle estão representados na região negativa CP1 e na região negativa da segunda dimensão CP2. Neste caso, a maior quantidade de

carvacrol e timol neste período é a principal razão para a sua aglomeração comparativamente para as amostras restantes (Tabela 3). As amostras isoladas na região positiva da dimensão (CP1) e na região negativa da dimensão 2 (CP2) representada pelas amostras da adubação mineral da primeira colheita (AM1), deve-se aos compostos α -tujeno e α -pineno que apresentaram maiores concentrações nas plantas submetidas a adubação mineral na primeira colheita, como também o composto mirceno que apresentou maior concentração na primeira colheita independente do adubo utilizado, justificando o isolamento da amostra (AO1).

Em relação a atividade antioxidante pelo método DPPH, poder redutor (PR) e ABTS sua presença na região positiva da dimensão 2, onde estão mais expressivas as amostras da terceira e quarta colheita e a ausência de carvacrol indicando menor concentração neste período, corresponde a menor atividade antioxidante. No sentido inverso, representadas nos extremos opostos da ACP estão as amostras da primeira e segunda colheitas, amostras que reportaram menores valores de CE_{50} , ou seja, maior atividade antioxidante

A informação da ACP sintetiza todos os dados obtidos na composição química e atividade antioxidante de *Lippia origanoides* nas quatro épocas de colheita e nos dois tipos de adubação e controle. Esta informação é essencial para compreender o efeito e influência da metodologia aplicada.

CONCLUSÕES

1. A espécie *Lippia origanoides* apresenta como componentes majoritários do óleo essencial carvacrol, linalol, p -cimeno; γ -terpineno, (E)-cariofileno, biciclogermacreno e timol.
2. A época de colheita influencia na concentração dos dois principais componentes encontrados no óleo essencial da *Lippia origanoides*, sendo que o linalol aumenta ao longo do período do ano e o carvacrol tem sua concentração reduzida;
3. A adubação das plantas de *Lippia origanoides* promove aumento das concentrações do p -cimeno e do timol;

4. Os testes de DPPH, Poder Redutor e ABTS comprovam o potencial antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K.
5. A adubação e a época de colheita influenciam o potencial antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides*, sendo que as amostras que apresentam maior teor de carvacrol possuem maior atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.B. **Identification of essential oil components by gas chromatograph/mass spectrometry**. Carol Stream: Allured, 2007. p.804.

ALCÂNTARA, J.M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA JUNIOR, V.F. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE *Aniba* E *Licaria* E SUAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA. **Quimica. Nova**, n.1,V. 33, p. 141-145, 2010.

AMMAR, I.; ENNOURI, M.; KHEMAKHEM, B.; YANGUI,T.; ATTIA,H.Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. **Industrial Crops and Products**, v.37, p. 34– 40, 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v.15, n.2, p.169-72, 2004.

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B. M. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenoides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BEDOYA, O.A. et al. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del Alto Patia **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v.10, n.2, p. 79 – 86, 2012.

BECKER, E., NISSEN, L., SKIBSTED, H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, n.6, v.219 , p. 561 – 571, 2004.

BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage-Myrtaceae**. Curitiba, 2009. 139f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides*, Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, market and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2,p. 179-189,2000.

CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.J.; OLIVEIRA, D.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; PAROUL, N., ASTOLFI, V.; SERAFINI, L.A. **Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, n.2, v.30, p.378-384, 2010.

CAVALCANTE, I.M.S.M. et al. Potencial Mutagênico (Teste de micronúcleos) e composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Lippia origanoides*. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química,

Fortaleza-CE, **Anais...**Fortaleza: Adaltech Soluções para eventos, 2009. Disponível em: <sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/ resumos/T0627-2.pdf>. Acesso em: 10/01/2013.

CAVAR, S. et al. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 648-653, 2008.

CAVAR, S.; MAKSIMOVI, M.; VIDIC, D.; PARI, A. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 479– 485, 2012.

CELIS, N.; ESCOBAR, P.; ISAZA, J.; STASHENKO, E.; MARTÍNEZ, J. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* (*Lippia*) *dulcis*, espécies de la familia Verbenaceae. **Scientia et Technica**, n.13, v.33, p. 103 – 105, 2007.

CORRÊA, R.M.1; PINTO, J.E.B.P.; REIS, E.S.; COSTA, L.C.B.; ALVES, P.B.; NICULAN, E.S.; BRANT, R.S. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.1, p.80-89, 2010.

DAMIAN, R.A. 2011. **Caracterização fitoquímica, morfoanatômica e atividades biológicas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. Welch, Myrtaceae.** 2011. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

FERREIRA, S.H. (org.) Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil, Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**, 1998, 142 p. Disponível em: <http://www.abc.org.br>. Acesso em 20 out. 2005.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. pacote computacional).

FRANKEL, E.; MEYER A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1925 – 1941, 2000.

GAMA, EVG. 2011. **Biomassa, óleo essencial e nutrição de *Lippia Alba* (Mill) N.E.Br. em função da adubação com compostos orgânicos inoculados sem inoculação de actinomicetos**. 2011. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

GARCÍA-BARRIGA, H.G. **Flora Medicinal de Colombia, Botânica Médica**. Tomo II. 2ª ed, Bogotá: Tercer Mundo,1992, p.508. Disponível em: <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies>. Acesso em 20 out. 2012.

GUIMARÃES, R.; SOUSA, M. J.; FERREIRA, I. F. F. R. Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p.152-156, 2010.

HATANO, T.; KAGAWA, H.; YASUHARA, T.; OKUDA, T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative. e astringency and scavenging effects. **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, v.36, 2090-2097, 1988.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, 2012.

JOULIN, D., KONIG, W.A. **The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons**. Hamburg: EB-Verl, 1998. p.658.

LETIZIA, C. S. et al. Fragrance material review on linalool. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 7, p. 943-964, 2003.

LOAYZA, I. et al. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. Latifolia* and *B. Dracunculifolia*. **Phytochemistry**.1995, v.38, n.2, p. 381-9.

MALHEIRO, R.; SA, O.; PEREIRA, E.; AGUIAR, C.; BAPTISTA, P.; PEREIRA, J.A. *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, V.37, P. 473– 478, 2012.

MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill. subespécie *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat., Myrtaceae**. Curitiba, 2010, 117f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 53, n. 2, p. 127-130, 2001.

MIMICA-DUKIC, N. et al. Antimicrobial and antioxidant of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2485-2489, 2004.

OLIVEIRA, D.R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236–240, 2007.

OLIVEIRA, D.R. et al. Análise sazonal da composição química do óleo essencial de salva-de-marajó (*Lippia origanoides* Kunth). In: VI Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. Campinas - SP, 2011. **Anais...** Disponível em:

<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/itstream/doc/906553/1/SBOE2011p214.pdf>>. Acesso em: 01/03/2012.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radicals in Biology and Medicine**, n., v. 9, p. 1231–1237, 1999.

RENCHE, A. C. (1995). *Methods of Multivariate Analysis*. John Wiley, New York.

ROBY, M.H.H.; SARHAN, M.A.; SELIM, K.A.H.; KHALEL, K.I. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops and Products**, V.44, P. 437– 445, 2013.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIOS, C.G.; JIMÉNEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Embrapa Agroindústria Tropical. **Informe Técnico**: Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. Fortaleza, 2007. 4 p. <. Disponível em: <www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/artigo>. Acesso em: 18 nov. 2013

SANTOS, A.S. et al. Embrapa Amozônia Ocidental. **Informe técnico**: Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Belém, 2004. p.6. Disponível em: <www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online>. Acesso em: 18 mar.2009

SANTOS, F., LOPES, J., CITO, G., de OLIVEIRA, E., de LIMA, S., de AM REIS, F. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, p. 504 – 506, 2004.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palma-rosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SILVA, F.G. et al. Influence of manure and fertilizer on *Baccharis trimera* (Less.) DC. growth and essential oil yield. **Herbs, Spices e Medicinal Plants**, v.12, n1/2. p.24-30, 2006.

SILVA, G.C. 2012.**Biorreguladores vegetais, substratos e estaquia em *lippia origanoides kunth (verbenaceae)***. 2012. 97p. Dissertação (Mestrado em Recurso Genético Vegetais)-Curso de Pós-Graduação em Recurso Genético Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana.

SILVA, M.M. et al. Variação de timol e carvacrol em *Lippia microphylla* Cham. ao longo do dia. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza–CE, 2009. **Anais...** Disponível em: <sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/-resumos/T1075-1.pdf>. Acesso em: 09/11/2009.

SILVESTRI, J.D.F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n.5, p. 589-594, 2010.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; RUÍZ, C.A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal Separation Science**, v. 33, p.93-103, 2010.

STASHENKO, E., JARAMILLO, B, y MARTÍNEZ, J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias**, v.27, p. 579 – 597, 2003.

TUBA, A.; GÜİLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n.1, p.27-37, 2008.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia de DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007

VERBEL, J.O; CERVERA, J.G. FERNANDEZ, J.G.; COLORADO, B.J.;STASHENKO, E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants.**Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n.4, v. 20, p. 565-574, 2010.

CAPÍTULO 3

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia Origanoides* H.B.K NO
CONTROLE *in vitro* DE *Aspergillus niger* , ISOLADO DO SISAL (*Agave
sisalana*)¹**

¹ Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Journal of Natural Products

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia Origanoides* H.B.K NO CONTROLE *in vitro* DE *Aspergillus niger* , ISOLADO DO SISAL (*Agave sisalana*)

Autora: Simone Teles

Orientadora: Dra.Franceli da Silva

RESUMO: Estima-se em torno de 70% a perda da produção agrícola por doenças ocasionadas pelos fungos. O sisal (*Agave sisalana*), importante cultura da região semiárida, vem declinando sua produção anual da fibra em razão da podridão vermelha causada pelo *Aspergillus niger*. Devido aos danos causados ao meio ambiente por meio dos produtos sintéticos, tem crescido na agricultura a busca por produtos naturais no controle desse e de outros fitopatógenos. Neste contexto, os óleos essenciais têm sido estudados como alternativa no controle de doenças de plantas, visando reduzir o uso de agrotóxicos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *Aspergillus niger* van Tieghem. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado, com óleos obtidos em quatro épocas de colheita (janeiro, abril, julho e outubro), cinco concentrações (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e dois controles (BDA e BDA+ tween). As extrações do óleo essencial das folhas+inflorescência de *Lippia origanoides* foram realizadas através da hidrodestilação durante 3 horas. No teste *in vitro*, para inibição do crescimento micelial, concentrações de cada um dos óleos essenciais foram incorporadas ao BDA (Batata-dextrose-ágar). Posteriormente, discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram transferidos para o centro de cada placa. O crescimento foi mensurado e calculada a taxa de inibição do crescimento micelial. Para germinação dos conídios foram utilizadas placas de microtitulação contendo 98 poços, sendo adicionados o meio BD e os óleos nas concentrações determinadas. Os resultados demonstraram que o óleo essencial de *Lippia origanoides* obtido nas quatro épocas de colheita inibiu completamente o crescimento de *Aspergillus niger*, independentemente da concentração. A esporulação do fungo foi 100% inibida a partir da concentração de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A germinação dos esporos foi reduzida à medida que aumentou-se na concentração do óleo essencial. Conclui-se que o uso do óleo essencial de *Lippia origanoides* possui potencial no controle de *A. niger*.

Palavras-chave: bioativos, fitopatógeno, sisal

EFFECT OF ESSENTIAL OIL FROM *Lippia origanoides* H.B.K. IN THE CONTROL OF *Aspergillus niger in vitro*, ISOLATED FROM SISAL (*Agave sisalana*)

Author: Simone Teles

Supervisor: Dra. Franceli da Silva

ABSTRACT: It's estimated a loss of about 70% of agriculture production due to diseases generated by fungi. The sisal (*Agave sisalana*), an important crop of the semiarid region, is reducing its annual production of fiber due to the bole rot caused by *Aspergillus niger*. Due to the damages caused to the environment by the use of synthetic products, the demand for natural products in agriculture is increasing for the control of these phytopathogens. In this way, essential oils are being studied as important alternatives in the control of this disease in plants, aiming the reduction of agrototoxic products use. The present work intended to evaluate the effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil over the mycelia growth, sporulation and spore germination of *Aspergillus niger* van Tieghem. The experiment was conducted in the Phytopathology Laboratory of the Federal University of Recôncavo da Bahia, using an experimental outline completely randomized, with essential oils being obtained from four harvest seasons (January, April, July, and October), at five concentrations (0.125; 0.25; 0.5; 1 and 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and using two controls (PDA and PDA plus tween). The essential oil extractions of leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* were made by hydro-distillation during 3 hours. In the *in vitro* evaluation, for the growth mycelia inhibition, concentrations of each essential oil were incorporated in PDA (potato-dextrose-agar). Posteriorly, mycelia discs with 5 mm of diameter were transferred to the center of each plate. The growth was measured and the rate of mycelia growth inhibition was calculated. For the conidia germination were used plates of microtiter containing 98 wells, being added the culture medium and the concentration of each essential oil. Regarding mycelia growth, the results demonstrated that the obtained essential oil of *Lippia origanoides* in the four harvest seasons inhibited completely *Aspergillus niger* growth, independently of its concentration. The fungi sporulation was 100% inhibited at a concentration of 0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Spores germination was reduced with the concentration applied of essential oil. It was concluded that the use of *Lippia origanoides* essential oil possess potentialities in the control of *A. niger*.

Keywords: bioactive; phytopathogen; sisal

INTRODUÇÃO

As medidas atuais de controle de fitopatógenos envolvem o uso de defensivos de origem sintética que apresentam um elevado custo e seu uso contínuo interrompe o controle biológico natural, além induzir à formação de espécies resistentes (SOYLU et al., 2010).

Em decorrência dos problemas ambientais e os efeitos tóxicos provocados por produtos sintéticos, estudos voltados para o uso de substâncias naturais vêm crescendo. Os óleos essenciais podem ser alternativa no controle de insetos-pragas e doenças de plantas causadas por fungos, nematoides, vírus e bactérias, e estes ainda podem ser associados às práticas de manejo integrado de doenças, podendo atender à grande procura atual por produtos para a produção agroecológica de alimentos (SILVA et al., 2010).

Trabalhos realizados com óleos essenciais evidenciam o potencial das plantas medicinais no controle de fitopatógenos. Tzortzakis e Economakis (2007) verificaram o controle do *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, e *Rhizopus stolonifer* com uso do óleo de *Cymbopogon citratus*. Soyly et al. (2010) também identificaram a ação do óleo de *Origanum syriacum*, *Lavandula stoechas* e *Rosmarinus officinalis* na inibição do crescimento de *Botrytis cinerea*. Gupta et al. (2011) avaliando seis espécies medicinais (*Mentha arvensis*, *Carum capticum*, *Cymbopogon citratus*, *Eugenia caryophyllata*, *Cedrus deodara* e *Eucalyptus globulus*) contra *Meloidogyne incognita* e *Fusarium oxysporum* obtiveram resultados positivos no controle em baixas concentrações do óleo essencial. Kedia et al. (2014) constataram atividade inseticida do óleo essencial de *Mentha spicata* no controle de *Collosobruchus chinensis*.

O óleo essencial do alecrim do tabuleiro (*Lippia origanoides* H.B.K) apresenta atividade biológica comprovada contra micro-organismos patogênicos, principalmente pela presença dos monoterpenos e sesquiterpenos (HYLDGAARD et al., 2012). Contudo, apesar do potencial dessa espécie, não foi encontrada a literatura referente ao seu uso no controle de fitopatógenos.

As perdas na produção das principais culturas, relacionadas ao ataque de pragas, incluindo insetos, nematoides e vírus, é estimada em até 50% (PIMENTEL et al., 1991; OERKE, 2006), sendo que cerca de 70% das doenças de plantas são ocasionadas por fungos (LEVETIN e MCMAHON, 2003). Na cultura do sisal (*Agave sisalana*), cultura de grande importância econômica e social para os agricultores da região semiárida do Nordeste, a realidade não é diferente, em virtude dos prejuízos causados pelo *Aspergillus niger* CONSOLI et al., 2009).

A fibra do sisal é utilizada em atividades de industrialização de diversos produtos, bem como para fins artesanais, sendo o Brasil o país que mais produz e exporta esta fibra natural e o Estado da Bahia o seu maior produtor, com aproximadamente 95,8% da produção nacional (AQUINO, 2012). O fungo *Aspergillus niger*, agente etiológico da podridão vermelha, vêm causando o declínio da produção anual da fibra de sisal (SOARES et. al., 2006). Essa doença encontra-se disseminada em 100% dos plantios na Bahia, com incidência média variando de 5 a 40% (ABREU, 2010). As plantas infectadas ficam amareladas e murçam, o caule apodrece e se desprende facilmente do solo, levando a planta à morte (LIMA et al., 1998).

Considerando que as pesquisas de controle de doenças fúngicas por meio do emprego de óleos essenciais tem crescido consideravelmente nos últimos anos (DINIZ et al., 2008), e que a exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes nos óleos essenciais da planta pode constituir uma forma efetiva de controle de doenças em plantas cultivadas, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *Aspergillus niger* isolado do sisal.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Obtenção do Fitopatógeno

O *Aspergillus niger* van Tieghem, isolado de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha, foi obtido da coleção de fungo do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Recôncavo, Cruz das Almas, BA.

2 Obtenção do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação no Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON) do Departamento de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS. Foram utilizadas plantas colhidas nos meses de janeiro, abril, julho e outubro.

Parte do material seco foi separado para determinação do teor de umidade. O procedimento foi realizado em triplicata no determinador de umidade (Série ID Versão 1.8 Marte®.); onde cada repetição continha 1g do material, as amostras foram secas a temperatura de 100°C, até que não houvesse variação na pesagem de 0,1% em 30 s.

Para extração do óleo essencial amostras de 100g de folhas+ inflorescência previamente secas e trituradas rapidamente em liquidificador industrial foram adicionadas em balão de vidro de 5 litros contendo água destilada em volume suficiente para cobertura total do material vegetal, iniciando o processo de hidrodestilação. Foram adotados aparatos do tipo Clevenger graduados, acoplados a balões de vidro, que foram aquecidos por mantas térmicas elétricas com termostato. O processo de extração foi conduzido durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota, sendo verificado o volume de óleo extraído na coluna graduada do aparelho de Clevenger. Com objetivo de remover a água residual foi adicionado ao óleo essencial sulfato de sódio anidro para evitar perdas por hidrólise durante o armazenamento. Posteriormente, com o uso de pipeta do tipo Pasteur, o óleo foi acondicionado em frasco de vidro de 2 mL envolto com papel alumínio, etiquetado e armazenado em congelador comercial a -5 °C ao abrigo da luz.

3 Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Aspergillus Niger*

Os óleos essenciais foram previamente diluídos em Tween 20, um surfactante não iônico e emulsionante, utilizado como agente dispersante para solubilizar óleos essenciais em água (GENNARO, 1995) e que, segundo Nascimento et al. (2007), em concentrações entre 0,5 e 20% possui efeitos antimicrobianos mínimos. Dessa forma, foi utilizado como controle Tween 20 a 10% para avaliar a interferência deste solvente no crescimento microbiano.

O fungo *A. niger* foi multiplicado em meio BDA (batata-dextrose-ágar) por sete dias a temperatura ambiente ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$) e discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram transferidos assepticamente para as placas de Petri contendo o meio BDA com as concentrações dos óleos essenciais (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$). O óleo foi misturado em meio de cultura BDA, quando o meio se encontrava na temperatura próxima ao ponto de solidificação.

As placas foram incubadas a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e o crescimento micelial foi avaliado a cada 48 horas, a partir da instalação do experimento, por meio da medição do diâmetro da colônia com uma régua milimetrada, em dois sentidos diametralmente opostos, durante o período de 14 dias de incubação.

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), (Bastos, 1997), foi aplicada a fórmula:

$$\text{PIC} = \frac{\text{Cresc. testemunha} - \text{Cresc. tratamento}}{\text{Cresc. testemunha}} \times 100$$

Onde:

Cresc. test = diâmetro da testemunha

Cresc. trat = diâmetro do tratamento

Ao final deste período avaliou-se a esporulação do fungo. Para a contagem de esporos nas culturas crescidas no meio BDA com óleo essencial, foram colocadas sobre a cultura de *Aspergillus niger* na placa de Petri, 20 mL de solução salina com duas gotas de Tween 20 e, em seguida, a colônia foi

raspada com alça de Drigalski para a obtenção da suspensão de esporos. A contagem de esporos de *Aspergillus niger* foi feita em câmara de Neubauer e microscópio óptico. O número de conídios produzidos foi expresso em números de conídios por cm².

Os tratamentos consistiram dos óleos essenciais obtidos em quatro épocas (janeiro, abril, julho e outubro) nas concentrações (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2 µL mL⁻¹). Os controles consistiram de meio BDA e BDA+Tween 20 a 10% sem adição do óleo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x6) + 2 (4 óleos essenciais, 6 concentrações e 2 controles) com seis repetições.

4. Efeito *in vitro* do óleo essencial de sobre a germinação dos esporos de *Aspergillus niger*

Para avaliar a inibição da germinação de esporos de *A. niger*, foram adicionadas ao meio batata dextrose (BD) as concentrações do óleo essencial (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2 µL mL⁻¹). Posteriormente adicionaram-se 150 µL do meio BD contendo as concentrações, em poços de placas de microtitulação (placas com 98 poços), sendo utilizados oito poços para cada tratamento. Cada poço recebeu 150 µL da suspensão de esporos de *Aspergillus niger* na concentração 10⁶ conídios mL⁻¹. As placas foram incubadas a 28,5°C em câmara de crescimento tipo BOD. Os controles negativos foram constituídos de tween 20 a 10% e meio de cultura BD (Batata-dextrose) sem adição do óleo essencial. A avaliação foi por meio da contagem aleatória dos esporos, registrando-se o número de esporos germinados e não germinados no total de 100 esporos, após a adição de uma gota de lactofenol, em todos os tratamentos, para paralisar a germinação de esporos. A adição do lactofenol ocorreu no momento em que o tratamento controle apresentou 50% de esporos germinados. Foi considerado como esporo germinado aquele cujo tubo germinativo apresentava o comprimento superior ao dobro do diâmetro do esporo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x6) + 2 (4 óleos essenciais, 6 concentrações e 2 controles) com cinco repetições.

5. Análise Estatística

As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância pelo teste de F e aplicado o teste de agrupamento de Scott-Knott ($P < 0,05$). Para as médias das concentrações foram ajustados modelos de regressão polinomial. As médias das testemunhas foram comparadas com as médias dos demais tratamentos pelo teste t de contrastes ortogonais a 5% de significância. As análises foram realizadas com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000) e SAS-M (CANTERI et al. 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Efeito *in vitro* do óleo essencial *Lippia origanoides* sobre do crescimento micelial (cm) *Aspergillus niger*

O crescimento micelial de *Aspergillus niger* foi inibido nas diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides*, obtidos em quatro épocas do ano (Figura 1). A média do crescimento micelial entre os tratamentos foi de 0,23 a 1,42 cm contrastando com a testemunha, o fungo cresceu em média 8,0 cm (Figura 2).

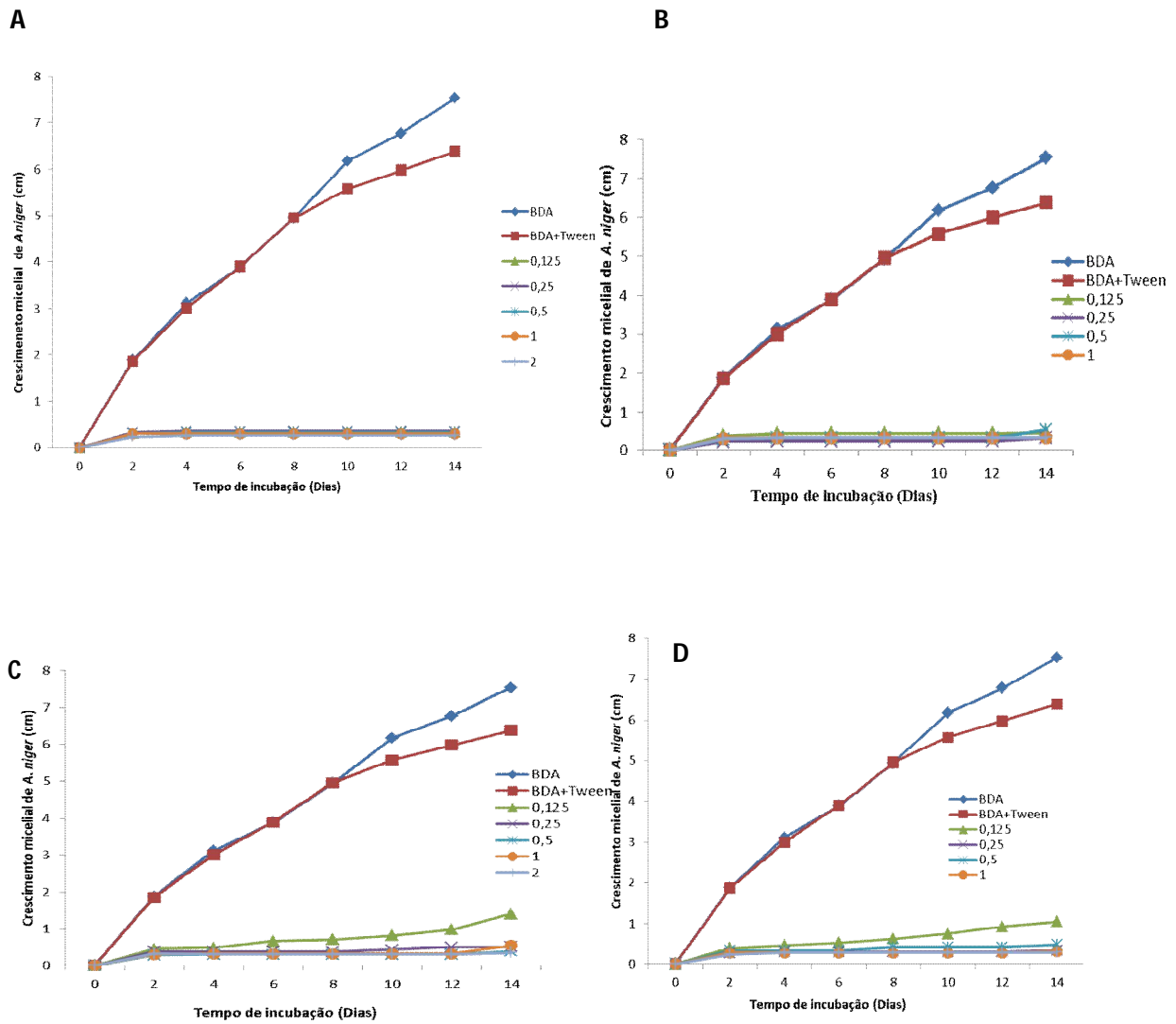


FIGURA 1. Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K no crescimento micelial (cm) do *Aspergillus niger*. A= óleo obtido da primeira colheita (C1), B= óleo obtido da segunda colheita (C2); C= óleo obtido da terceira colheita (C3); D= óleo obtido da quarta colheita (C4).

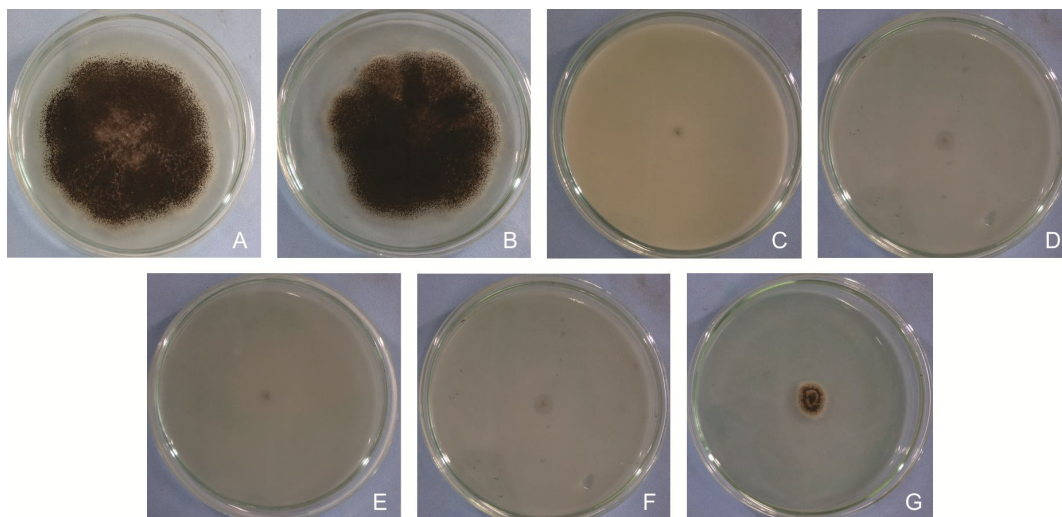


FIGURA 2: Comportamento do *Aspergillus niger* em meio BDA acrescido de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K, obtido na terceira colheita, no crescimento do *A. niger*. A= controle BDA; B=controle BDA+Tween; C= 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$; D= 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$; E= 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$; F= 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$; G= 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Durante o período de incubação, foi possível observar que, a partir da menor concentração avaliada, houve um efeito positivo na inibição do crescimento do *Aspergillus niger* (Figura 1).

Após o sexto dia de avaliação do crescimento, observou-se um maior desenvolvimento do patógeno na concentração de 0,125 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para os óleos obtidos na terceira e quarta colheita, sendo possível constatar que para nesses tratamentos houve uma maior eficiência na inibição do crescimento micelial do fungo, a partir da concentração de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Figura 1). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os estudos feitos por outros autores com diferentes espécies. Souza Júnior et al. (2009), avaliando concentrações do óleo essencial de *Lippia sidoides* observaram que 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ inibiu totalmente o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose no maracujeiro amarelo (*Passiflora edulis* f *flavicarpa* Deg.). Jeong et al. (2009) constataram que o óleo de *Cymbopogon citratus* apresentou atividade inibitória sobre *Aspergillus niger*, observando a completa inibição do crescimento após 48 h de incubação. Já Tian et al. (2012) avaliando o óleo essencial de *Cinnamomum jensenianum* nas concentrações (1, 2, 4, 6, e 8 $\mu\text{L mL}^{-1}$) observaram inibição no crescimento micelial do *Aspergillus flavus* à medida que aumentou-se a concentração e os dias de incubação (9 dias).

2. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre inibição do crescimento micelial e esporulação de *Aspergillus niger*

A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi determinada aos 14 dias. O *Aspergillus niger* se desenvolveu bem nos tratamentos controle. Entretanto, a adição do óleo essencial inibiu significativamente o crescimento do fungo (Figura 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Pereira et al. (2006), em óleo essencial de menta, onde os autores observaram inibição do desenvolvimento micelial de *Aspergillus niger* e *Aspergillus. flavus* nas concentrações 1500 e 2000 mg mL⁻¹, respectivamente. Martins et al. (2010) verificaram que o óleo de *Melaleuca arternifolia* reduziu o crescimento micelial dos fungos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Alternaria alternata*, a partir da concentração de 0,2% incorporada ao meio de cultura. Hillen et al. (2012), em estudos realizados com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) também verificaram inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* em todas as concentrações (20, 40, 60, 100, 200, 500 e 1000 µL mL⁻¹) testadas. Kumar et al. (2014) avaliando óleo essencial de *Erigeron annuus*, verificaram a inibição de 85% no crescimento micelial do *Fusarium oxysporum*, 82 % sobre *Rhizoctonia solani* e 65% sobre *Sclerotinia solani*.

Os óleos essenciais das quatro colheitas inibiram em torno de 95% o crescimento micelial de *A. niger* (Figura 3). De acordo com os resultados obtidos na composição química do óleo essencial, descrito no capítulo anterior, o teor de carvacrol, componente majoritário conhecido por sua atividade antimicrobiana (HYLDGAARD et al., 2012), variou ao longo das colheitas, apresentando concentrações mais baixas na terceira e quarta época. Contudo, não influenciou negativamente a inibição do crescimento do fitopatógeno. Sugere-se então, que a ação antifúngica do óleo possa estar associada também à presença de outros componentes, incluindo os minoritários. Segundo Montanari et al. (2011), os constituintes minoritários do óleo essencial da espécie são críticos e podem influenciar a atividade antimicrobiana através de um efeito sinérgico, potencializador ou antagônico.

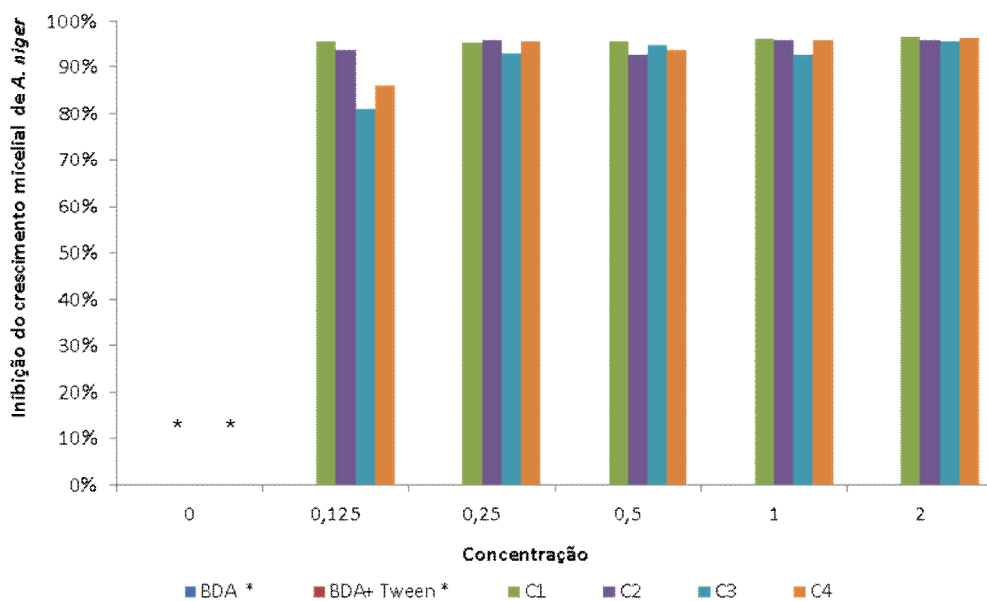


FIGURA 3 Porcentagem de inibição do crescimento micelial, *in vitro*, de *Aspergillus niger* em diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia organoides* H.B.K obtidos em quatro época de colheita. C1= primeira colheita (janeiro); C2= segunda colheita (abril); C3= terceira colheita (julho); C4=quarta colheita (outubro).

Na menor concentração testada ($0,125 \mu\text{L mL}^{-1}$) do óleo essencial foi possível observar a inibição do crescimento do fitopatógeno. De acordo com Fontenelle et al. (2007) os principais constituintes de óleos essenciais extraídos de plantas que exercem atividade antifúngica importante são compostos fenólicos como o timol, carvacrol ou eugenol. A forte ação exercida pelo óleo essencial de *L. organoides* sobre o desenvolvimento micelial de *A niger* provavelmente ocorreu devido à presença do carvacrol. Esta observação está correlacionada a outros estudos que destacam a atividade antifúngica desse composto (KIM et al., 1995; CURTIS et al., 1996; ARRAS e USAI, 2001; CHEBLI et al. 2003).

Em relação à esporulação do *A. niger*, o óleo essencial de *L. origanoides* foi mais eficiente a partir da concentração $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$ inibindo 100% a produção de esporos. Entretanto, na concentração $0,125 \mu\text{L mL}^{-1}$ observou-se esporulação superior à testemunha (Figura 4). Possivelmente, isto pode ser explicado devido ao estresse em que o fungo foi submetido através da adição do óleo essencial favorecendo uma maior produção de esporo em relação a testemunha. Segundo Carnelossi et al. (2009), os óleos essenciais de plantas medicinais têm apresentado efeito fungicida tanto na esporulação quanto na germinação de conídios de diferentes fitopatógenos.

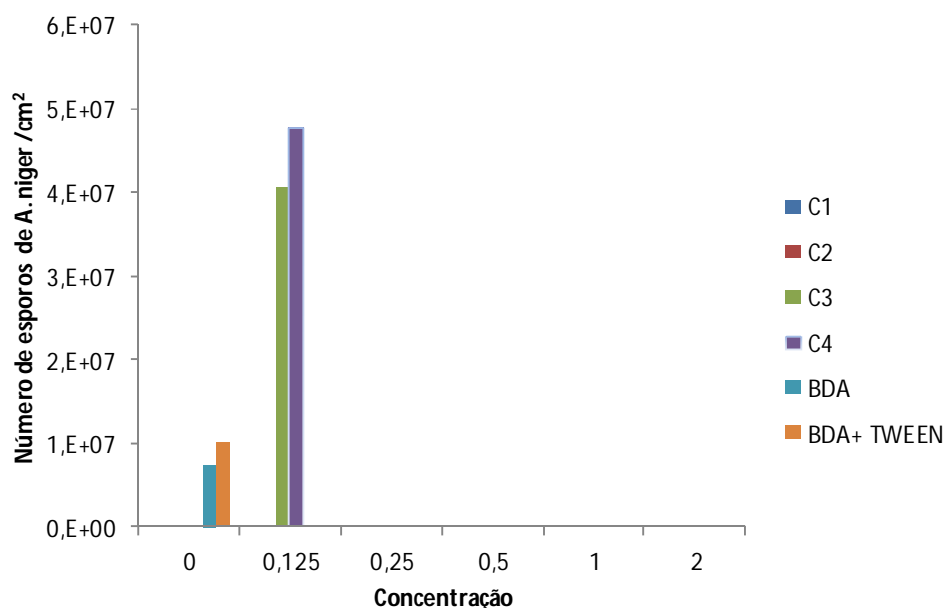


FIGURA 4 Esporulação (n° conídios cm^{-2}) de *Aspergillus niger* em diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides* obtidos em quatro época de colheita. C1= primeira colheita (janeiro); C2= segunda colheita (abril); C3= terceira colheita (julho); C4=quarta colheita (outubro)

Os resultados obtidos indicam que o óleo essencial de *Lippia origanoides* apresenta efeito fungitóxico *in vitro* sobre o desenvolvimento do fungo *A. niger* tanto no crescimento micelial como na esporulação.

3. Efeito *in vitro* dos óleos essenciais sobre germinação dos esporos de *Aspergillus niger*

A eficiência do óleo essencial *Lippia origanoides* sobre a inibição da germinação de *A. niger* é apresentada na Figura 5. Os dados obtidos indicam que o potencial inibitório do óleo essencial na germinação do esporo foi evidenciado à medida que aumentou a concentração do óleo essencial (Figura 5). A partir da concentração de 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo essencial de *Lippia origanoides*, ocorreu em média 91% da inibição de germinação dos esporos.

Apesar das menores concentrações inibirem em torno de 95% o crescimento do fungo, o mesmo não foi observado para germinação de esporos, onde foi possível observar 65% de inibição (Figura 5). Segundo French (1992), os compostos químicos presentes em substâncias voláteis podem estimular ou inibir o desenvolvimento e a germinação de esporos de fungos em determinadas concentrações.

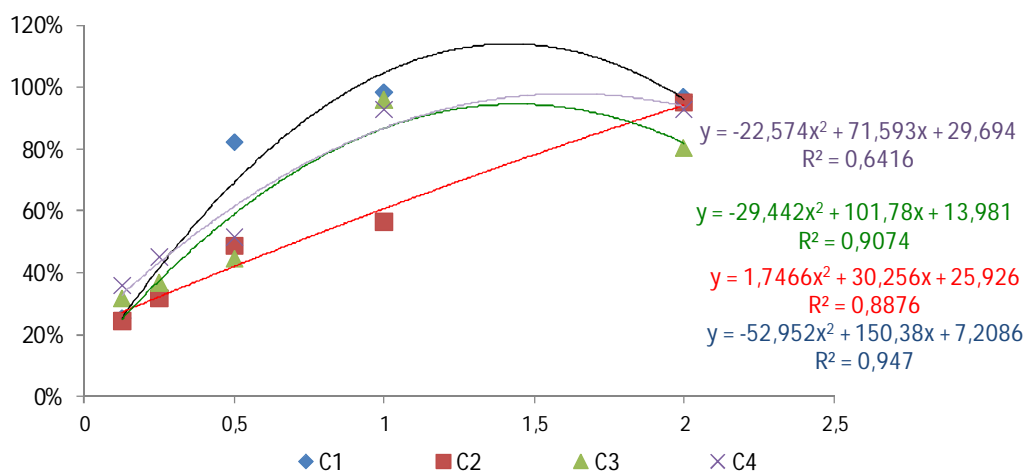


FIGURA 5. Porcentagem de inibição germinação de conídios de *Aspergillus niger* em diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K obtidos em quatro épocas de colheita. C1= primeira colheita (janeiro); C2= segunda colheita (abril); C3= terceira colheita (julho); C4=quarta colheita (outubro)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, o óleo essencial obtido na primeira colheita se mostrou mais eficiente, sendo capaz de inibir a germinação dos esporos de *A. niger* em 82%, na concentração de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, alcançando em média 97,6% nas concentrações 1 e 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Somente a partir da concentração de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ o óleo obtido na terceira colheita atingiu uma inibição acima dos 90%, sendo que os mesmos resultados para os óleos da segunda e quarta colheita só foi possível na concentração de $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ (Tabela 1). Em experimento realizado com outras espécies medicinais os resultados de germinação atingiram 100% de inibição. Estudos feitos por Silva e Bastos (2007) com *Piper dilatatum*, *Piper callosum* e *Piper marginatum* var. *anisatum*, nas concentrações de 0,4 e $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ encontraram 100% de inibição na germinação de basidiosporos de *Crinipellis pernicioso*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. Nas espécies de *Cymbopogon nardus* e *Thymus vulgaris* também foi possível verificar a inibição total da germinação dos uredinosporos de *Phakospora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem da soja (MEDICE et al. 2007). Souza Júnior et al. (2009) também observaram que os óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham e *Lippia citriodora* Kunth nas concentrações 1, 3, 5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiram em 100% a germinação dos esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Já Kumar et al. (2014) em estudos com diferentes espécies do gênero *Erigeron*, não observaram a inibição total da germinação dos esporos, contudo houve uma inibição significativa entre 78 a 97,5% na concentração 2000 mg mL^{-1} sob o *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

TABELA 1. Porcentagem de inibição da germinação de esporo de *Aspergillus niger* H.B.K em diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides* obtidos em quatro épocas de colheita. C1= primeira colheita (janeiro); C2= segunda colheita (abril); C3= terceira colheita (julho); C4=quarta colheita (outubro) .

| Amostras | Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$) | | | | | Controle | |
|----------|--|---------|---------|---------|---------|----------|-----------|
| | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | BDA | BDA+Tween |
| C1 | 25.16 b | 34.15 b | 82.00 a | 98.20 a | 97.07 a | 0.00 | 8.53 |
| C2 | 24.26 b | 31.91 b | 48.76 b | 56.04 c | 94.83 a | 0.00 | 8.53 |
| C3 | 31.91 a | 36.62 b | 44.71 b | 95.95 a | 98.20 a | 0.00 | 8.53 |
| C4 | 35.95 a | 45.16 a | 51.23 b | 80.44 b | 92.80 a | 0.00 | 8.53 |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Acredita-se que a natureza física dos óleos essenciais, de baixo peso molecular e de característica lipofílica, permita-lhe penetrar nas membranas celulares rapidamente (JEONG et al. 2009). Estudos feitos por Burt et al. (2005) e Edris (2007) comprovam a alta eficiência dos óleos essenciais em

penetrar nos tecidos, sendo 100 vezes mais rápido do que a água e 10.000 vezes mais rápida do que os sais. Além disso, os óleos essenciais contêm vários compostos com atividade antimicrobiana (JEONG et al. 2009) que atuam na ruptura da membrana celular (KNOBLOCH;PAULI; IBERL, 1989). Tais descrições corroboram com os resultados encontrados por Toluee et al. (2010), onde os autores verificaram por meio da microscopia de varredura, alterações na morfologia do *A. niger* quando exposto a diferentes concentrações do óleo essencial de *M. chamomilla*.

CONCLUSÕES

- O óleo essencial de *Lippia origanoides* obtido em quatro épocas distintas de colheita, apresenta efeito fungitóxico sobre a inibição do crescimento micelial de *Aspergillus niger* em todas as concentrações testadas;
- As concentrações 1 e 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo essencial de *Lippia origanoides* proporcionam maiores taxas de inibição da germinação dos esporos;
- Os testes *in vitro* indicam o potencial de uso do óleo essencial de *Lippia origanoides* no controle de *A. niger*.

REFERÊNCIAS

ABREU K.C.L.M. 2010. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. 2010. 100p. Tese (Dotourado em Ciências Agrárias)-Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

ARRAS, G., USAI, M. Fungitoxic activity of twelve essential oils against four postharvest Citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* (L.) Hofmegg oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. **Journal of Food Protection**, v. 64, p v.1025–1029, 2001.

AQUINO, DJALMA F. **Sisal - Proposta de Preço Mínimo 2012/2013: Conab, 2012 – Estudos Internos**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/isa2012.pdf> . Acesso em: 25 jan. 2014.

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.441-3, 1997.

BURT, S. A., VLIELANDER, R., HAAGSMAN, H. AND VELDHIJZEN, P. E. J. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. **Journal Food Protection**, v. 68, p.919-926, 2005.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CARNELOSSI, P.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; MESQUINI, R.M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.4, p.399-406, 2009.

CHEBLI, B. A; MOHAMED ACHOURI B; L.M. IDRISSE HASSANI C; Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. **Journal of Ethnopharmacology**,v. 89, p.165–169, 2003.

CONSOLI. M.A., SCARE, R. F., PINTO, M. J. A. MARKESTRAT. **Plano de Melhoria Competitividade do APL dos Fornecedores da Indústria Automotiva**. Ribeirão Preto, 2009, p.119.

CURTIS, O.E., SHETTY, K., CASSAGNOL, G., PELEG, M. Comparison of the inhibitory and lethal effects of synthetic versions of plant metabolites (anethole, carvacrol, eugenol, and thymol) on a food spoilage yeast (*Debaromyces hansenii*). **Food Biotechnology**, v .10, p.55–75, 1996.

DINIZ, S. P. S. S.; COELHO, J. S.; ROSA, G. S.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R. C.; OLIVEIRA, R. R. Bioatividade do óleo essencial de *Mentha arvensis* L. no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 9-11, 2008.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials o essential oils and their individual volatile constituents: A review. **Phytotherapy Research**, v. 2, p.308-323, 2007.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4.1 pacote computacional) .

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.

FRENCH, R.C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, v.84, n.3, p.277-288, 1992.

JEONG MR; PARK PB; KIM DH; JANG YS; JEONG HS; CHOI SH. Essential oil prepared from *Cymbopogon citrates* exerted an antimicrobial activity against plant pathogenic and medical microorganisms. **Mycobiology**, v.37, p. 48-52, 2009.

KEDIA. A; PRAKASH, B.; MISHRA, P.K., CHANOTIYA, C.S.; DUBEY, N.K. Antifungal, antiaflatoxicogenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 89, p. 29-36, 2014.

KIM, J.M., MARSHALL, M.R., WIE, C.I. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.43,p. 2839–2845, 1995.

KNOBLOCH, K., PAULI, A.; IBERL, B. Antibacterial and antifungal properties of essential oils components. **Journal of Essential Oil Research**, v.1, p.119-128, 1989.

KUMAR, V; MATHELA, C.S.; TEWARI, G.; SINGH, D.; TEWARI, A.K.; BISHT, K.S. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from three Himalayan Erigeron species. **Food Science and Technology**, v.56,p. 278-283, 2014.

GENNARO, A. R. **Remington: the science and practice of Pharmacy**.19. ed, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995.

GUPTA, A.; SHARMA, S.; NAIK, S.N. Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 65, p.703-707, 2011.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; MESQUINI, R.M.; CRUZ, M.E.S.; Stangarlin, J.R.; Nozaki, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, 2012.

LIMA, E.F.; MOREIRA, J. de A.N.; BATISTA, F.A.S.; SILVA, O.R.R.F.da; FARIAS, F.J.C.; ARAÚJO, A.E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, 1998.

LEVETIN; MCMAHON, 2003. **Fungi and human health: Drugs, poisons, pathogens, allergies**. Disponível em: <http://www.sbs.utexas.edu/mbierner/BIO-305E/Lectures,%20etc/Fungi%20V.pdf>. Acesso em: 29 Jan.2014.

MARTINS, J. A. S.; SAGATA, E.; SANTOS, V. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 49-51, 2010.

MEDICE, R., ALVES, E.; ASSIS, R. T.; JUNIOR, R. G. M; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da Ferrugem Asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd, e P. Syd. **Ciencia agrotecnologica**, v.3, n1,p. 83-90, 2007.

MONTANARI, R. M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: alternative sources of (*E*)-caryophyllene and germacrene-D. **Química Nova**, [S.l.], v. 34, n. 9, p. 1550-1555, 2011.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 108-113, 2007.

OERKE, E.C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 144, p. 31-43, 2006.

PIMENTEL, D., MCLAUGHLIN, L., ZEPP, A., LAKITAN, B., KRAUS, T., KLEINMAN, P., VANCINI, F., ROACH, W., GRAAP, E., KEETON, W., SELIG, G. Environmental and economic effects of reducing pesticide use. **Bioscience**, v. 4, p. 402-409, 1991.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32: p.143-145, 2007.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. **Informe Agropecuário**, v. 31, n. 255, p. 70-77, 2010.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, **Anais...** BA. 2006.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.

SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3., p. 183-189, 2010.

TIAN, J.; HUANG, B.; LUO, X.; ZENG, H.; BAN, X.; HE, J.; WANG, Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz

essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v. 130, p. 520-527, 2012.

TOLOUEE, M. et al. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p.127–133, 2010

TZORTZAKIS, N.G., Economakis, C.D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p. 253-258, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Lippia origanoides* apresenta potencial para ser inserida no mercado de produtos naturais. Foi constatado neste trabalho que existem poucas pesquisas com essa espécie.

O cultivo de *Lippia origanoides* é viável, uma vez que se estabeleceu bem em casa de vegetação e em campo. No entanto, por se tratar de uma espécie medicinal, sua produção foi influenciada pelos fatores analisados: época de colheita e adubação.

Ao longo dos meses de avaliação (janeiro, abril, julho e outubro) foi possível verificar um aumento de biomassa e conseqüentemente maior rendimento de óleo essencial. Portanto, os maiores teores de óleo foram obtidos nos meses de Janeiro e Abril. Visando a produção do princípio ativo da *Lippia origanoides*, os primeiros meses seriam os mais indicados para a colheita, já que, neste período, houve um maior acúmulo de óleo essencial.

Em relação à adubação, nos primeiros meses de colheita, não obteve-se diferenças significativas entre as diferentes formas de adubação, ou seja, o produtor poderá optar por um dos tipos de adubo (orgânico e mineral), levando em consideração que o cultivo orgânico é o mais indicado, pois permite o maior equilíbrio entre a produção e o ambiente.

O constituinte majoritário identificado em todas as amostras foi o carvacrol, que possui elevada atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias patogênicas; O linalol, segundo constituinte majoritário nas terceira e quarta colheitas, confere a essa espécie potencial para ser utilizada na indústria cosmética pelo seu aroma floral.

A capacidade antioxidante do óleo essencial da *Lippia origanoides* é um indicador da aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia.

Os dados antimicrobianos sugerem que o uso do óleo essencial dessa espécie é uma alternativa para o controle de *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha do sisal. Os resultados foram promissores, inibindo em até 100% o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *Aspergillus niger in vitro*. Contudo, sugere-se que futuros trabalhos sejam feitos em campo para verificar a eficiência do óleo essencial no controle da doença e

atividade tóxica do óleo sobre plantas e animais, com objetivo desenvolver uma metodologia segura para aplicação.

Este foi um dos trabalhos iniciais com a *Lippia origanoides*, visando não somente o uso potencial do seu óleo, como também o estabelecimento de técnicas de produção. O conhecimento das características agronômicas, químicas e bioativas da planta é necessário para atender um mercado competitivo e exigente por padrão de qualidade, visto que a busca na produção de espécies com origem definida e garantias mínimas de qualidade na produção representam um nicho de mercado com maior rentabilidade.

Logo, os resultados gerados por essa pesquisa apresentam grande possibilidade de difusão do conhecimento, tanto para as indústrias quanto para os produtores rurais.