



RAFAELA MALHEIROS SALOMON

**ADUBAÇÃO VERDE COM *Crotalaria juncea* AFETA A
PRODUÇÃO DE BIOMASSA E O METABOLISMO DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS E FENÓLICOS DE *Lippia dulcis*
Trevir. (Verbenaceae)**

**LAVRAS- MG
2023**

RAFAELA MALHEIROS SALOMON

**ADUBAÇÃO VERDE COM *Crotalaria juncea* AFETA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA
E O METABOLISMO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E FENÓLICOS DE *Lippia dulcis*
Trevir. (Verbenaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Mestre.

Prof^a. Dr^a. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora
Prof Dr^o. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Coorientador

**LAVRAS-MG
2023**

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

Salomon, Rafaela Malheiros.

Adubação verde com *Crotalaria juncea* afeta a produção de biomassa e o metabolismo de compostos voláteis e fenólicos de *Lippia dulcis* Trevir (Verbenaceae) / Rafaela Malheiros Salomon. - 2023.

63 p.

Orientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Coorientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Capim doce. 2. Adubação química. 3. Metabolismo secundário. I. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. II. Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. III. Título.

RAFAELA MALHEIROS SALOMON

**ADUBAÇÃO VERDE COM *Crotalaria juncea* AFETA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA
E O METABOLISMO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E FENÓLICOS DE *Lippia dulcis*
Trevir. (Verbenaceae)**

**GREEN MANUREMENT WITH *Crotalaria juncea* AFFECTS BIOMASS
PRODUCTION AND METABOLISM OF VOLATILE AND PHENOLIC
COMPOUNDS OF *Lippia dulcis* Trevir. (Verbenaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de Março de 2023

Prof Dr^o Osmar Alves Lameira EMBRAPA

Prof Dr^o Ricardo Monteiro Corrêa IFMG

Prof^a. Dr^a. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Prof Dr^o. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Coorientador

**LAVRAS-MG
2023**

*Aos meus pais, por serem sempre meu
porto seguro.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Foram dois anos que me possibilitou encerrar um ciclo nessa universidade que me acolheu, com muito crescimento, amadurecimento e gratidão. Diante disso não posso deixar de agradecer a todos que fizeram parte dessa história.

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de estar aqui, e por sempre renovar no meu coração a paz e a fé nos momentos difíceis dessa jornada.

Aos meus pais, pelo incansável apoio, mesmo de longe. Por serem meu porto seguro, meu maior amor, minha inspiração e exemplo de caráter e valores. Obrigada por estarem sempre comigo e por não medirem esforços para me verem feliz. Amo vocês.

Aos meus avós, *in memoriam*, que eu sempre carrego comigo a saudade e a herança deixada por vocês. Aos meus tios e primos por todo o suporte para que eu chegasse até aqui, em especial ao meu tio Márcio, por me apresentar novas visões sobre a vida.

A família que eu fiz em Lavras, vocês são um dos motivos por eu estar aqui até hoje. Obrigada por serem um lar pra mim fora de casa e por estarem sempre caminhando junto comigo, nos momentos bons e ruins, em especial a Fernanda, Isadora, Renata e Bruna.

Aos novos amigos que o Horto Medicinal me trouxe. Deus sempre é muito maravilhoso em colocar as pessoas na minha vida. Obrigada pela amizade, pelas inúmeras ajudas nesse trabalho e pelos incontáveis trocas e aprendizados. Ao Marlon, Jeremias, João, Fabrícia, Alessandra, Jandeilson, Lissa, Ione, Giulia, Dico, Anete e todos os outros que passaram por mim. Obrigada por tornarem esse ano mais leve.

Aos meus orientadores, professora Suzan e professor José Eduardo, pela orientação, pela paciência, pelos inúmeros ensinamentos e amizade. Vocês são inspiração pra mim pela dedicação e amor as plantas medicinais.

À UFLA, por ser o local onde as minhas melhores memórias ficarão registradas.

Aos órgãos de apoio à pesquisa CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFLA pelas oportunidades de bolsa.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação profissional e ao meu amadurecimento pessoal, o meu muito obrigada.

RESUMO GERAL

As plantas medicinais são afetadas por diversos fatores, dentre eles, a adubação. A *Lippia dulcis* é uma planta medicinal empregada no tratamento de tosse, resfriados e bronquite. Apresenta na sua composição química óleos essenciais e compostos fenólicos, incluindo verbascosídeo. Objetivou-se avaliar a influência da adubação verde (AV) com *Crotalaria juncea* no crescimento vegetativo e no acúmulo de óleo essencial, compostos fenólicos totais e verbascosídeo em *Lippia dulcis*. O experimento foi conduzido em campo e possuiu sete tratamentos: Substrato terra e areia; Adubação com esterco de gado (450 g/vaso 10 L); Adubação química; Adubo verde com 150 g/vaso 10 L; Adubo verde com 300 g/vaso 10 L; Adubo verde com 450 g/vaso 10 L; Adubo verde com 600 g/vaso 10 L. Foi avaliado o peso seco, análise foliar, teores de pigmentos fotossintetizantes, fenólicos totais, flavonóides totais, verbascosídeo e teor, rendimento e análise química do óleo essencial. Para a biomassa da planta o tratamento mais significativo se deu com o uso de 600 g de AV. Para o teor e rendimento do óleo essencial foram as doses 450 e 600 g de AV. Para o verbascosídeo e flavonóides totais foi o tratamento controle. Para os compostos fenólicos os tratamentos mais eficientes foram a adubação química e AV na dose de 300 g. Portanto a adubação verde se mostrou positiva para o cultivo da espécie *Lippia dulcis*. Além de ser uma estratégia mais barata e sustentável no cultivo de plantas medicinais.

Palavras chaves: Capim doce. Adubação química. Metabolismo secundário.

GENERAL ABSTRACT

Medicinal plants are affected by several factors, including fertilization. *Lippia dulcis* is a medicinal plant used in the treatment of coughs, colds and bronchitis. It presents in its chemical composition essential oils and phenolic compounds, including verbascoside. The objective was to evaluate the influence of green manuring (GM) with *Crotalaria juncea* on vegetative growth and accumulation of essential oil, total phenolic compounds and verbascoside in *Lippia dulcis*. The experiment was conducted in the field and has seven treatments: Soil and sand substrate; Fertilization with cattle manure (450 g/10 L per pot); Chemical fertilization; Green manure with 150g per 10 L pot; Green manure with 300 g per 10 L pot; Green manure with 450g per 10 L pot; Green manure with 600 g per 10 L pot. The dry weight was evaluated; leaf analysis; levels of photosynthetic pigments, total phenolics, total flavonoids and verbascoside; and, content, yield and chemical analysis of the essential oil. For plant biomass, the most significant treatment was with the use of 600 g of GM. For the essential oil content and yield, were the doses of 450 and 600 g of GM. For verbascoside and total flavonoids it was the control treatment. For phenolic compounds, the most significant treatments were chemical fertilization and GM at a dose of 300 g. Therefore, green manuring was positive for the cultivation of the *Lippia dulcis* species. In addition to being a cheaper and more sustainable strategy in the cultivation of medicinal plants.

Keywords: Sweet grass. Conventional fertilization. Secondary metabolism.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Caracterização botânica da espécie <i>Lippia dulcis</i> e usos na medicina tradicional	12
2.2 A química da espécie.....	14
2.3 Adubação como um fator influenciador do metabolismo secundário de plantas	17
2.4 Adubação verde.....	18
2.5 <i>Crotalaria juncea</i>	19
REFERÊNCIAS	21
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	25
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Área de estudo.....	29
2.2 Plantio da crotalária	30
2.3 Obtenção do material vegetal de <i>Lippia dulcis</i>	30
2.4 Avaliações	31
2.4.1 Acúmulo de biomassa	31
2.4.2 Teores de pigmentos fotossintetizantes	32
2.4.3 Análise foliar	32
2.4.4 Teor, rendimento e análises químicas do óleo essencial	33
2.4.5 Análises químicas dos compostos fenólicos	34
2.4.5.1 Preparo das amostras	34
2.4.5.2 Fenóis totais	34
2.4.5.3 Flavonoides totais.....	34
2.4.5.4 Análises químicas de verbascosídeo por CLAE-FR	35
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Acúmulo de biomassa	37
4.2 Teores de pigmentos fotossintetizantes	41
4.3 Teor, rendimento e análises químicas do óleo essencial	42
4.4 Compostos fenólicos.....	46
4.5 Análises multivariadas	51

5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

Plantas medicinais têm sido utilizadas como base para tratamento de diversas doenças há vários séculos e vem sendo aplicada até os dias de hoje como uma alternativa ao uso de medicamentos sintéticos. Quando usadas adequadamente, essas plantas garantem eficiência, apresentam efeitos colaterais baixos, quando comparadas aos medicamentos convencionais (TOMASZEWSKA-SOWA, 2020). Dados da OMS sugerem que aproximadamente 80% da população mundial fazem uso de medicamentos fitoterápicos (AHMA; KHAN, 2019).

Lippia dulcis Trev é uma das espécies pertencentes a família Verbenaceae que possui diversas propriedades medicinais. Oriunda da América Central, há relatos do sabor adocicado presente em suas folhas desde 1552 (TOMASZEWSKA-SOWA, 2020). A substância responsável por esse dulçor é a hernandulcina, um composto químico orgânico pertencente ao grupo dos terpenóides, considerado 1000 vezes mais doce que a sacarose, com baixo teor de calorias, porém sensível a altas temperaturas (COMPADRE et al., 1985; GORNEMANN et al., 2008, ADAMS; OLIVEIRA, 2016). Outro composto presente nas folhas de *Lippia dulcis* é o verbascosídeo (ONO et al., 2005), um feniletanóide que além de propriedades biológicas, antioxidante e anti-inflamatória (VERTUANI et al., 2011), também demonstrou atividade inibitória sobre a enzima α -glicosidase *in vitro* (RITTER et al., 2023). Outros terpenos, comumente usados em cosméticos e na indústria farmacêutica também foram relatados no óleo essencial de *Lippia dulcis*, tais como cânfora e α -bisabolol. Na medicina tradicional é usada no tratamento de tosse resfriado, bronquite, asma e cólica (NAYAL; MELZIG, 2005). Segundo os mesmos autores, na Amazônia brasileira essa espécie é conhecida como capim doce, e seu chá é popularmente empregado no controle de diabetes e como calmante.

Tendo em vista que é uma planta que produz diversos compostos de interesse cosmético e farmacêutico e sabendo que a produção de metabólicos secundários é influenciado por questões genéticas, ontogênicas e ambientais, estudos de manejo agrícola que visem maximizar a produção vegetal e a produção de constituintes de interesse são importantes para a exploração econômica da espécie.

O Brasil é um dos países que mais exporta produtos agrícolas no mundo e possui uma alta dependência do mercado externo para compra de adubos. De acordo com a ANDA

(Associação Nacional para Difusão de Adubos), o país importa cerca de 85% dos fertilizantes utilizados na agricultura. Devido ao aumento do dólar, o adubo mineral se tornou muito caro, o que se faz necessário investimentos em novas técnicas de adubação, como por exemplo adubações orgânica e verde, como uma alternativa mais econômica para o produtor (AGROLINK 2021).

Adubação verde é uma prática agrícola que tem efeito positivo sobre as características físicas químicas e biológicas do solo, o que promove melhores condições para o desenvolvimento da cultura agrícola de interesse econômico. Para o cultivo de plantas medicinais isso é muito importante, pois a produção de metabólitos secundários é influenciada diretamente por fatores genéticos e ambientais. Em um estudo realizado com hortelã (*Mentha arvensis* L.), em consórcio com o adubo verde feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) a biomassa fresca da planta medicinal teve um aumento de 23,4% e o rendimento do óleo essencial de 25,2% com a adubação (SINGH et al., 2010). A *Crotalaria juncea* L. é uma espécie pertencente à família das leguminosas muito usada como adubo verde devido a sua alta fixação de nitrogênio no solo (DA EIRA AGUIAR et al., 2014).

Diante disso, objetivou-se avaliar a influência da adubação verde com *Crotalaria juncea* no crescimento vegetativo e no acúmulo de óleo essencial, compostos fenólicos totais e verbascosídeo em *Lippia dulcis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização botânica da espécie *Lippia dulcis* e usos na medicina tradicional

O gênero *Lippia* L. pertence à família Verbenaceae e possui em torno de 200 espécies registradas entre ervas, arbustos e pequenas árvores. Seus maiores centros de disseminação são encontrados em países das Américas do Sul e Central, e também em territórios da África tropical (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011).

A espécie *Lippia dulcis* possui alguns sinônimos como *Phyla dulcis* Moldenke e *Zappania scaberrima* Juss. ex Pers, e durante anos ocorreram problemas com sua correta nomenclatura botânica, devido à dificuldade da sua identificação. Segundo O'Leary e Múlgura (2012), a espécie foi excluída do gênero *Phyla*, pois não apresenta tricomas do tipo malpiguiáceos.

Lippia dulcis, também conhecida como capim doce ou erva doce dos astecas, é uma planta medicinal de ocorrência em climas tropicais. Oriunda da América Central, a espécie é difundida do sul do México até Colômbia, Cuba e Venezuela. Nessas regiões, é comum encontrá-la próxima a margens de pântanos ou pastos, em solos de bosques e ao longo de rios, em altitudes que variam desde o nível do mar até 1800 m (SOUTO-BACHILLER et al., 1997).

As plantas de *Lippia dulcis* são ervas de comportamento perene, com caules ramificados de base lenhosa; seu hábito de crescimento pode ser ereto ou decumbente a prostrado, enraizando a partir dos nós, e podem atingir uma altura/comprimento de até 60 cm (FIGURA 1). Suas folhas são inteiras, ovaladas, de coloração esverdeada a vermelho-arroxeadas, quando mais velhas, possuem pecíolos de comprimento entre 0,5 e 1,5 cm, com margens dentadas a serrilhadas; a face adaxial da folha é áspera e a face abaxial apresenta tricomas capitados glandulares, as folhas apresentam sabor adocicado devido a presença de hernandulcina, um sesquiterpeno, do tipo bisabolano. Suas inflorescências, do tipo capítulo, possuem de 1 a 5 cm de comprimento e estão localizadas nas axilas das folhas, apresentando pequenas brácteas alongadas. O cálice de cada flor é bem pequeno, e as pétalas são brancas com 1 a 1,5 mm de comprimento (NAYAL; MELZIG, 2005).

Figura 1 - Exemplar da espécie *Lippia dulcis*.



Fonte: da autora (2021).

No que diz respeito de propagação de espécie medicinais os estudos ainda são escassos. Segundo Adams; Oliveira, 2016; Dwivedi, 2022; Ribeiro et al., 2022 as plantas de *Lippia dulcis* podem ser propagadas de forma sexuada, através de sementes, e assexuada através da estaquia. Pesquisas recentes mostram que plantas de *Lippia dulcis* propagadas através da micropropagação, em diferentes condições in vitro, tiveram um bom pegamento e produziram mudas com melhores condições para a fase de aclimação (ROCHA et al., 2022; ROCHA et al., 2023).

Existem relatos antigos do uso de *Lippia dulcis* para fins medicinais. Os povos astecas já utilizavam essa planta como remédio natural para tosse e obstrução urinária. Na América Central ela é empregada como decocção no tratamento de tosse, resfriado, bronquite, asma e cólica. A sua tintura foi usada nos Estados Unidos também para o tratamento de bronquite e como expectorante (COMPADRE et al., 1985). Em suínos, a atividade anti-histaminérgica e anticolinérgica do óleo essencial de *Lippia dulcis*, a 100 g mL^{-1} , diminuiu a concentração de carbacol e histamina (substâncias broncoconstritoras) (GÖRNEMANN et al., 2008). Em ratos, o extrato etanólico de *Lippia dulcis* apresentou atividade anti-inflamatória em fases proliferativas da inflamação (PÉREZ et al., 2005).

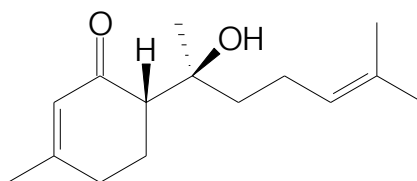
Em estudo realizado com 84 plantas da Guatemala usadas para tratamento de distúrbios gastrointestinais demonstrou que, dentre outras espécies, a *Lippia dulcis* possui atividade

antibacteriana frente às bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Shigella flexneri* (CÁCERES et al., 1993).

2.2 A química da espécie

Em 1985, Compadre e colaboradores, buscando diferentes fontes de vegetais com substâncias intensamente doces descobriram, na literatura botânica mexicana, a *Lippia dulcis*, espécie já usada para tratamento de tosse e bronquite desde o século XIX, contudo não existiam relatos sobre seu uso como um adoçante de alimentos e bebidas. Essa espécie possui um sabor adocicado decorrente da presença de hernandulcina (FIGURA 2), composto químico presente em suas folhas e flores, e pode ser 1000 a 1500 vezes mais doce que a sacarose, mas ligeiramente amargo no fim (COMPADRE; ROBBINS; KINGHORN, 1986; KANEDA et al., 1992).

Figura 2 – Estrutura química da hernandulcina



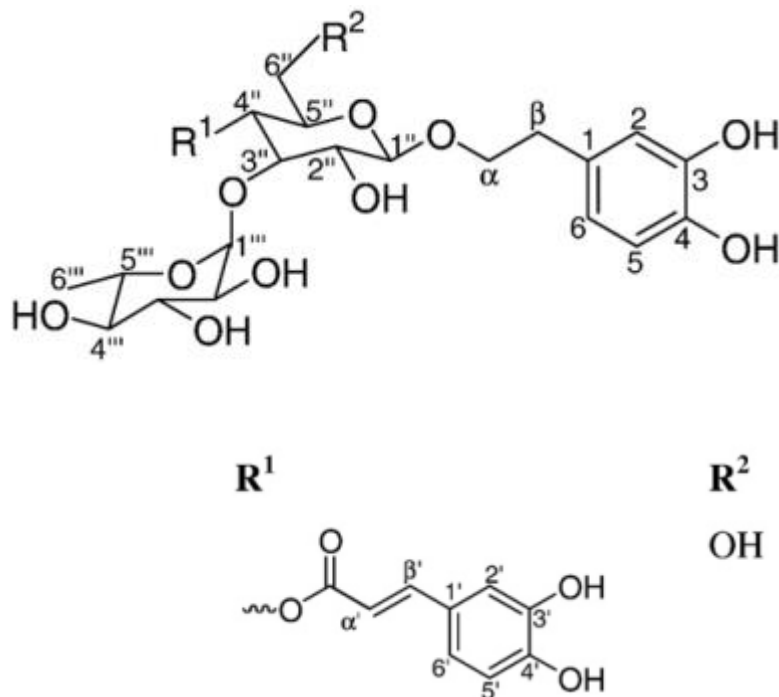
Fonte: Compadre et al. (1985).

Relatos sobre a composição química das plantas de *Lippia dulcis* são variáveis. Plantas coletadas em Porto Rico e caracterizadas quimicamente por meio da cromatografia gasosa apresentaram alta porcentagem de sesquiterpenóides (79%), constituído principalmente por (+) hernandulcina (36%) e seu epímero (-) epi-hernandulcina (22%) (SOUTO-BACHILLER et al., 1997). Já em plantas cultivadas na Alemanha, apresentaram, além da hernandulcina, a cânfora, como principais constituintes do óleo essencial (GÖRNEMANN et al., 2008).

O óleo dessa espécie encontrado no Brasil apresentou baixo teor de cânfora e é rico em 6-metil-5-hepten-2-ona (10,5%), α -copaeno (8,6%), (E)-cariofileno (10,6%), biciclogermacreno (6,6%), δ -cadineno (7,2%), epi- α -bisabolol (6,5%) e hernandulcina (8,8%). Além disso, continha β -cedreno e α -calacorene. Já no óleo de plantas vindas do México possuía alto teor de cânfora (33,9%), além de canfeno (12,7%), limoneno (4,6%), α -copaeno (4,0%), (E)-cariofileno (6,0%) e hernandulcina (5,9%) (ADAMS et al., 2016).

Cinco flavanóides já conhecidos foram identificados a partir do extrato metanólico de partes áreas de *Lippia dulcis*: cirsimaritina, salvigenina, eupatorina 5-hidroxi-6,7,3, 4-tetrametoxiflavona e 5,3-dihidroxi-6,7,4, 5 –tetrametoxiflavona, junto com dois novos sesquiterpenos do tipo bisabolano, lippidulcina e espilipidulcina e três glicosídeos feniletanoídes descafeoilverbascosídeo, isoacteosídeo e acteosídeo, também conhecido como verbascosídeo (FIGURA 3) (ONO et al., 2005).

Figura 3 – Estrutura química do verbascosídeo



Fonte: Olivier et al. (2010).

O verbascosídeo é um glicosídeo feniletanoide, isolado pela primeira vez do verbasco (*Verbascum thapsus* L), mas presente também em outras espécies de plantas e que tem apresentado diversas propriedades de interesse medicinal e cosmético. Em *Lippia dulcis* foi isolado pela primeira vez por Kaneda et al (1992). Possui diversas propriedades biológicas, antioxidante, anti-inflamatória, fotoprotetora. (VERTUANI et al., 2011). A atividade anti-inflamatória foi avaliada em ratos que foram induzidos à colite por instilação intracolônica de ácido 2,4 dinitrobenzeno sulfônico (DNBS; 25mg/rato). O verbascosídeo foi administrado de forma oral na dose de 0,2mg e 2mg por quilo do animal. Resultados desses estudos demonstraram que o verbascosídeo atuou na eliminação dos radicais intracelulares, reduzindo o nível microscópico e macroscópicos de colite nesses animais, o que confirmou o benefício da sua administração para tratamento de doenças inflamatórias intestinais (MAZZON et al., 2009).

Em um outro trabalho, o extrato de verbena limão (*Aloysia citrodora*), contendo verbascosídeo, foi administrado em ratos (2180 mg/ kg, correspondendo a 545 mg/kg do verbascosídeo), onde observaram a correlação entre a maior concentração de verbascosídeo no plasma e a capacidade antioxidante máxima do plasma através de técnicas como geração mínima de malondialdeído, maior capacidade de redução férrica do plasma e atividade máxima da superóxido dismutase, mostrando forte capacidade antioxidante do verbascosídeo (FUNES et al., 2009). Para avaliar a atividade fotoprotetora, o verbascosídeo foi isolado do extrato metanólico da *Buddleja cordata* e administrado em camundongos expostos à radiação UV-B aguda e crônica. A ação do verbascosídeo na pele do camundongo foi avaliada pelo método *stripping*. Todos os camundongos protegidos com verbascosídeo não apresentaram sinais de queimadura solar após exposição aguda à UV-B, e 100% dos camundongos desprotegidos apresentaram carcinomas de pele após exposição crônica (ESPINOSA-GONZÁLEZ et al., 2016).

Em uma revisão de literatura, Khalaf et al 2021 demonstraram que o verbascosídeo possui efeitos em atividades anticancerígenas contra diversos tipos de tumores como câncer de fígado, pulmão, cerebral, colorretal, mama, hematológicos, próstata e de pele. O verbascosídeo se mostrou mais tóxico em células cancerígenas na pele de camundongos do que em células não cancerígenas. O que indicou seletividade em relação às células tumorais. Em células da próstata de um rato, o tratamento com verbascosídeo preveniu a proliferação e migração de células cancerígenas (KHALAF et al., 2021).

Além dessas atividades, o verbascosídeo vem sendo estudado como sendo um importante inibidor da α -glicosidase para o tratamento de diabetes (SEETALOO et al., 2019). Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2020, cerca de 9.3% da população adulta brasileira vivem com diabetes. Desse número, em torno de 90% têm a diabetes Tipo 2 (SBD, 2022). Em um trabalho foi induzido diabetes em ratos. A administração oral de 200 e 300 mg/kg de peso corporal do extrato de *Marubium vulgare* induziu um efeito antidiabético e anti-hiperlipidêmico significativo. Houve uma diminuição de 50% da glicose no sague, quando administrado nas doses de 100mg/kg, em doses de 200 e 300 mg/kg, teve diminuição em mais de 60%. Além de reduzir significativamente níveis de lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol total nos animais tratados (BOUDJELAL et al., 2012).

2.3 Adubação como um fator influenciador do metabolismo secundário de plantas

O metabolismo pode ser definido como uma rede integrada de reações químicas mediadas por enzimas e cuidadosamente reguladas, que ocorrem em cada célula. As reações enzimáticas que são envolvidas nesse processo são denominadas de anabólicas, catabólicas ou biotransformação. Os compostos químicos que são derivados desses processos são os metabólitos, que podem ser divididos em primários e secundários. (PÉREZ-URRIA CARRIL; ÁVALOS GARCÍA, 2009).

O metabolismo primário das plantas é responsável pelas funções essenciais das mesmas, como por exemplo, seu crescimento e desenvolvimento celular, produzindo substâncias que são consideradas fundamentais a manutenção da vida e reprodução, como os aminoácidos, carboidratos, proteínas e lipídeos, são comuns a todo o reino vegetal. Já o metabolismo secundário produz moléculas orgânicas que possuem atividades biológicas marcantes que se relacionam com a adaptação do vegetal com o meio, porém não possui uma função direta com a fotossíntese, transporte celular ou armazenamento de energia, além de ter uma distribuição restrita a certas plantas (CHEN; CHEN, 2000).

Os metabólitos secundários possuem muitas funções ecológicas de grande relevância nas plantas, como a proteção contra os herbívoros e contra infecção por microrganismos patogênicos; são atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes, utilizando o odor, cor ou sabor; e atuam também como agentes na competição planta-planta. Portanto, a capacidade de competição e sobrevivência dos vegetais é diretamente influenciada por esses compostos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A produção dos metabólitos secundários é influenciada pela genética, ontogenia e também pelo ambiente, e vai variar conforme o desenvolvimento da planta. Essas substâncias estão relacionadas com os sabores, aromas e corantes naturais (BROWN et al., 1989).

Neste contexto, diferentes doses de adubos orgânicos (gado, frango e codorna) foram usados para avaliar o efeito na produção, rendimento e a composição química do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* L. Diferentes teores do óleo foram extraídos das inflorescências e nas folhas, sendo que o uso de 3 a 6 kg/ m⁻² de esterco bovino e 3 a 12 kg m⁻² de esterco de galinha proporcionaram maior teor de óleo extraído das folhas. A dosagem de 12 kg m⁻² de esterco de gado aumentou o teor de óleo extraído das inflorescências. Para o rendimento do óleo, os esterco de gado, frango e codorna em dosagens de 12 kg m⁻², 6 a 12 kg m⁻² e 9 kg m⁻²

², respectivamente obtiveram melhores resultados. O teor de ascaridol nas folhas teve um aumento com o uso de esterco de codorna, enquanto que para esse mesmo composto nas inflorescências teve um aumento com o uso de esterco de galinha (BIBIANO et al., 2019). Para a espécie de *Cymbopogon flexuosus*, doses diferentes adubos orgânicos (esterco bovino, de codorna e composto orgânico) também foram utilizados para avaliar teor, rendimento e composição química do seu óleo essencial. Nesse estudo, o esterco de codorna aumentou o conteúdo mineral do seu óleo em comparação com os demais adubos (LOPES et al., 2019).

A influência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a fertilização com adubo orgânico foi observada em *Melissa officinalis*, para os teores de fenóis, flavonoides e composição química do seu óleo essencial. A combinação de FMAs e esterco intensificaram a produção dessa espécie, proporcionando um maior teor, rendimento e conteúdo do ingrediente ativo do óleo essencial (DE ASSIS et al, 2020).

2.4 Adubação verde

Adubação verde é uma prática que se baseia no uso de plantas em rotação ou consórcio com outras culturas de que se tem o interesse econômico. Esses adubos verdes podem ser incorporados ao solo ou roçadas e mantidas na superfície, propiciando, uma melhora nas características físicas, químicas e biológicas do solo (ESPÍNDOLA et al., 1997).

Existem trabalhos publicados que comprovam o efeito dessas plantas nas características físicas, químicas e biológicas do solo. Isso ocorre devido ao aumento do teor de matéria orgânica, possibilitando uma maior disponibilidade de nutrientes, maior capacidade de trocas catiônicas, diminuição de teores de alumínio e ainda um aumento na capacidade de reciclagem e mobilização de nutrientes (CALEGARI et al.,1993). Contudo, é de conhecimento também que esses efeitos citados anteriormente podem variar de acordo com a espécie utilizada, a época em que foi realizado o plantio, as condições ambientais, o manejo realizado, o tempo de permanência dos resíduos no solo, e a interação desses fatores (ALCÂNTARA et al., 2000).

Estudo realizado com os adubos verdes incluindo feijão guandú (*Cajanus cajan*) e *Crotalaria juncea*, para avaliar a recuperação da fertilidade do solo degradado, demonstrou que após 90 dias da incorporação dessas espécies, os teores de $N-NO_3^- + N-NH_4^+$ tiveram um aumento nos primeiros 5 cm de profundidade, maior teor de K, Ca, e Mg nas profundidades de 10 a 20, 40 a 60 e 60 a 80 cm e maiores somas de base, CTC efetiva e saturação por bases nas

profundidades de 20 a 40, 40 a 60, 60 a 80 cm. O guandú teve melhores resultados no aumento da fertilidade do solo, nos primeiros 90 dias do experimento, a crotalária, por ter uma mineralização mais lenta, apresentou melhores resultados após 120 dias (ALCÂNTARA et., 2000).

A disponibilidade de nutrientes no solo é um fator que influencia diretamente tanto o metabolismo primário quanto a produção de metabólitos secundários nas plantas medicinais (GOBOO-NETO et al., 2007). Em um estudo com *Mentha arvensis* L, consorciada com o feijão caupi (*Vigna unguicullata*), a contribuição do adubo verde como fonte de nitrogênio, foi equivalente a 30 kg N/ ha, o que aumentou em 23,4% da biomassa fresca e em 25,2% o rendimento do óleo essencial da planta (SINGH et al., 2010).

Em outro estudo com *Lippia alba* cultivadas em sucessão com os adubos verdes crotalaria (*Crotalaria juncea* L), mucuna preta (*Mucuna aterrima* Holland) e feijão de corda (*Vigna unguicullata*), a utilização da mucuna preta proporcionou um aumento na produção da biomassa e do óleo essencial, além de aumentar a quantidade de alguns componentes presentes no óleo, como a carvona e limoneno, que conferem um maior valor do produto no mercado (DO SANTOS MARQUES et., al 2018).

As leguminosas, como a *Crotalaria juncea*, estão entre as espécies de plantas mais utilizadas como adubo verde por possuírem um sistema radicular bastante ramificado e profundo, o que facilita a extração dos nutrientes do solo das camadas mais profundas. Além disso, também são responsáveis pela fixação do nitrogênio atmosférico nas raízes, por meio da simbiose com as bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (MIYASAKA et al., 1984).

2.5 *Crotalaria juncea*

As plantas do gênero crotalária pertencem a família das leguminosas, são originárias da Índia, mas teve uma boa adaptação no Brasil devido ao clima tropical. (PEREIRA et al., 2005). São plantas anuais, de crescimento ereto, determinado e com vegetação arbustiva. São recomendadas como adubo verde em detrimento ao uso de adubos químicos nitrogenados. As espécies mais cultivadas desse gênero são *Crotalaria breviflora*, *C. juncea* e *C. spectabilis* (DA EIRA AGUIAR et al., 2014).

A *Crotalaria juncea* L é uma espécie que possui rápido crescimento inicial, podendo atingir uma altura entre 3,0 a 3,5 m, o que facilita o controle de plantas invasoras. Produzem fibras e celulose de alta qualidade para indústria de papel, mas seu principal uso é como adubo verde. Essa planta fixa em torno de 150 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N e possui relação C/N entre 17 e 19 (DA EIRA AGUIAR et al., 2014). Segundo os mesmos autores, tem uma produção de 10 a 15 t ha⁻¹ de matéria seca e 500 a 1.000 kg ha⁻¹ de sementes.

Suas sementes não possuem dormência e são fáceis de serem obtidas, é resistente a pragas e tem baixo índice de ataques de doenças, possui sistema radicular profundo que facilita a reciclagem de nutrientes e fixação do nitrogênio (WUTKE e ARÉVALO, 2006; PERIN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007), e ainda controla, comprovadamente, os nematoides formadores de galhas (DA EIRA AGUIAR et al., 2014). Todas essas características fazem dessa planta a mais recomendada para utilização como adubo verde.

Em um estudo para avaliar o efeito residual de diferentes doses de *Crotalaria juncea* em cultivo de brócolis, sobre sucessão de abobrinha italiana e milho, observou um aumento nas produções de abobrinha e milho na maior dose do adubo verde, e ainda houve efeito residual na cultura do brócolis, que foi proporcional a quantidade de adubo incorporado (DINIZ et al., 20014). Já em uma outra pesquisa também utilizando a crotalária, como adubo verde para produção de fitomassa aérea de atoveran (*Ocimum selloi Benth*), a planta não proporcionou melhores resultados quando incorporada aos tratamentos orgânicos utilizados (MORAIS et al., 2012).

A utilização da crotalária como adubo verde na cultura do milho proporcionou o desenvolvimento de rebentos nas plantas, devido ao seu alto teor de nitrogênio, além de promover melhorias nas características físico químicas do solo (SANGAKKARA et al., 2004).

Tendo em vista os benefícios citados, o uso da crotalária como adubo verde em *Lippia dulcis*, pode ser uma estratégia eficiente, favorecendo o desenvolvimento da cultura e produção de compostos químicos de interesse cosmético e farmacêutico.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert P.; OLIVEIRA, P. F. Comparison of intensely sweet volatile leaf oils of *Lippia dulcis* (Verbenaceae) with low and high camphor from Brazil and Mexico. **Phytologia**, v. 98, p. 207-212, 2016.
- AHN, Juhee; GRÜN, Ingolf U.; MUSTAPHA, Azlin. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food microbiology**, v. 24, n. 1, p. 7-14, 2007.
- ALCÂNTARA, Flávia Aparecida de et al. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um Latossolo Vermelho-Escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 277-288, 2000.
- ALVES, L. S. et al. Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de plantas de manjeriço submetidas ao estresse salino com NaCl. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 807-813, 2015.
- ANDA. **Associação Nacional para Difusão de Adubos**. Disponível em: <http://anda.org.br/pesquisa_setorial/>. Acesso em: 02 dez. 2021
- BIBIANO, Camila Silva et al. Organic manure sources play fundamental roles in growth and quali-quantitative production of essential oil from *Dysphania ambrosioides* L. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111512, 2019.
- BOUDJELAL, Amel et al. Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 286-292, 2012.
- BROWN, C.M.; CAMPBELL, I.; PRIEST, F.G. Introducción a la biotecnología. Zaragoza, Espanha: Acribia S.A, 1989. 167 p. CÁCERES, Armando et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 31-38, 1993.
- CALEGARI, A. et al. Adubação verde no Brasil. 2. ed. Rio de Janeiro: Assessoria de Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 1993. 346 p.
- CHEN, H.; CHEN, F. Effects of yeast elicitor on the grown and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. **Process Biochemistry**, [S.l.], v.35, p.837-840, 2000.
- COMPADRE, C. M. et al. Hernandulcin: an intensely sweet compound discovered by review of ancient literature. **Science**, New York, v. 227, p. 417-419, 1985
- CORRÊA, Darlena Caroline da Cruz. Efeito da fonte e dose de nitrogênio na emissão de gases de efeito estufa, acúmulo de forragem e composição química de *Urochloa brizantha* cv marandu. 2021.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- DA EIRA AGUIAR, Adriano Tosoni et al. **Instruções Agrícolas para as Principais Culturas Econômicas**. 2014.

- DE ASSIS, Rafael Marlon Alves et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic manure enhance growth and accumulation of citral, total phenols, and flavonoids in *Melissa officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p. 112981, 2020.
- DEB, Prashanta Kumar; SARKAR, Biswatrish. Seasonal variation of verbascoside as a principal phenolic compound linked with antioxidant potentials of *Clerodendrum glandulosum* Lindl. leaves. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2021.
- DINIZ, Ellen Rúbia et al. Doses of *Crotalaria juncea*: Residual effect on zucchini and maize crop in sequence to broccoli 1. **Revista Ceres**, v. 64, p. 600-606, 2017.
- DOS SANTOS MARQUES, Carla Teresa et al. Improvement of biomass and essential oil production of *Lippia alba* (Mill) NE Brown with green manures in succession. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 113-118, 2018.
- DWIVEDI, Ram Snehi. Hernandulcin (Sesquiterpene). In: **Alternative Sweet and Supersweet Principles: Natural Sweeteners and Plants**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 389-403.
- ESPÍNDOLA, José Antonio Azevedo; GUERRA, José GM; DE ALMEIDA, D. L. Adubação verde: estratégia para uma agricultura sustentável. **Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 1997.
- ESPINOSA-GONZÁLEZ, Adriana Montserrat et al. Photoprotective effect of verbascoside from *Buddleja cordata* in SKH-1 mice exposed to acute and chronic UV-B radiation. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 15, n. 5, p. 288-300, 2016.
- FUNES, L. et al. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. **Food Chemistry**, v. 117, n. 4, p. 589-598, 2009.
- GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, São Paulo, v. 36, n.1, p. 64-77, 2011
- GUNJAN, M. et al. Marketing trends & future prospects of herbal medicine in the treatment of various disease. **World Journal of Pharmaceutical Research, Houston**, v. 4, p. 132-155, 2015.
- GÖRNEMANN, T. et al. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 117, p. 166-169, 2008
- KANEDA, N. et al. (+)-4P-hydroxyhernandulcina, new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 55, n. 8, p.1130-1141, 1992
- KHALAF, Hasan Alaa Aldeen; JASIM, Ruaa Azziz; IBRAHIM, Ismail Taha. Verbascoside—A review of its antitumor activities. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 12, n. 6, p. 109-126, 2021.
- KHAN, Mohd Sajjad Ahmad; AHMAD, Iqbal. Herbal medicine: current trends and future prospects. In: **New Look to phytomedicine**. Academic Press, 2019. p. 3-13.

LOPES, Vauvenargues et al. Improvement of *Cymbopogon flexuosus* Biomass and Essential Oil Production With Organic Manures. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 2, 2019.

MALISZEWSKI, Elisa. O que explica a alta dos fertilizantes. **Agrolink**. Disponível em <https://www.agrolink.com.br/noticias/o-que-explica-a-alta-dos-fertilizantes-_452072.html> Acesso em: 25/01/2022

MAZZON, Emanuela et al. Effects of verbascoside biotechnologically produced by *Syringa vulgaris* plant cell cultures in a rodent model of colitis. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 380, n. 1, p. 79-94, 2009.

MIYASAKA, Shiro et al. Adubação orgânica, adubação verde e rotação de culturas no Estado de São Paulo. **São Paulo: Cargill**, 1984.

MORAIS, LAS de; BARBOSA, A. G. Influência da adubação verde e diferentes adubos orgânicos na produção de fitomassa aérea de *atroveran* (*Ocimum selloi* Benth.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 246-249, 2012.

NAYAL, R.; MELZIG, M. F. *Lippia dulcis* Trevis. **Zeitschrift für Phytotherapie**, Leipzig, v. 26, p. 42-46, 2005

O'LEARY, Nataly; MÚLGURA, María Ema. A Taxonomic Revision of the Genus *Phyla* (Verbenaceae) 1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 98, n. 4, p. 578-596, 2012.

OLIVIER, D. K. et al. Phenylethanoid glycosides from *Lippia javanica*. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 1, p. 58-63, 2010.

ONO, Masateru et al. New bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 9, p. 1175-1177, 2005.

PEREIRA, Arison José et al. Desempenho agrônômico de *Crotalaria juncea* em diferentes arranjos populacionais e épocas do ano. **Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2005..

PÉREZ, S. et al. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 1-4, 2005.

PÉREZ-URRIA CARRIL, Elena; ÁVALOS GARCÍA, Adolfo. Metabolismo secundario de plantas. 2009

RIBEIRO, Fernanda Naiara Santos et al. Fenologia e propagação vegetativa de *Lippia dulcis* Trevir (Verbenaceae). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. e298111638261-e298111638261, 2022.

RITTER RUAS, Natalia et al. Inhibition of α -Glycosidase by *Lippia dulcis* Trevir.(Verbenaceae) Preparations, Quantification of Verbascoside, and Study of Its Molecular Docking. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 2, p. e202200760, 2023.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 2-10, 2004.

ROCHA, Taina Teixeira et al. In vitro culture of *Lippia dulcis* (Trev.): light intensity and wavelength effects on growth, antioxidant defense, and volatile compound production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 58, n. 4, p. 636-652, 2022.

ROCHA, Taina Teixeira et al. Establishment and clonal propagation of *Lippia dulcis* Trevir. through in vitro single node cultures. **Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909**, v. 19, p. 19: e190-19: e190, 2023.

ROSADO, Luciana Domiciano Silva et al. Changes in the content and composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. during storage. **Journal of essential oil research**, v. 25, n. 3, p. 227-232, 2013.

SANGAKKARA, U. R. et al. Root and shoot growth of maize (*Zea mays*) as affected by incorporation of *Crotalaria juncea* and *Tithonia diversifolia* as green manures. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 190, n. 5, p. 339-346, 2004.

SEETALOO, A. D. et al. Potential of traditionally consumed medicinal herbs, spices, and food plants to inhibit key digestive enzymes geared towards diabetes mellitus management: asystematic review. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 120, p. 3-24, Jan. 2019.

SINGH, Man et al. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) as a green manure to improve the productivity of a menthol mint (*Mentha arvensis* L.) intercropping system. **Industrial crops and products**, v. 31, n. 2, p. 289-293, 2010.

SLINKARD, Karen; SINGLETON, Vernon L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American journal of enology and viticulture**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tipos de diabetes**. Disponível em: < <https://diabetes.org.br/tipos-de-diabetes/#diabetes-tipo-2> >. Acesso em: 4 fev. 2022

SOUTO-BACHILLER, Fernando A. et al. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1077-1086, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TOMASZEWSKA-SOWA, Magdalena. In vitro clonal propagation and efficient acclimatization with use of hydrogel of intensively sweet medicinal plant *Lippia dulcis* Trev. **Herba Polonica**, v. 66, n. 4, 2020.

VERTUANI, Silvia et al. Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7068-7080, 2011.

WUTKE, E. B. Adubação verde com leguminosas no rendimento da cana-de-açúcar e no manejo de plantas infestantes. **IAC**, 2006.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**ARTIGO 1 - ADUBAÇÃO VERDE AFETA O ACÚMULO DE BIOMASSA E
COMPOSTOS VOLÁTEIS E FENÓLICOS DE *Lippia dulcis* Trevir.
(VERBENACEAE)**

RESUMO

A *Lippia dulcis* Trevir. (Verbenaceae) é uma planta medicinal que tem potencial antidiabético e edulcorante. Apresenta na sua composição química óleos essenciais e compostos fenólicos, incluindo verbascosídeo. Objetivou-se avaliar a influência da adubação verde com *Crotalaria juncea* no crescimento vegetativo e no acúmulo de óleo essencial, compostos fenólicos totais e verbascosídeo em *Lippia dulcis*. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos T1: Substrato terra e areia; T2: Adubação com esterco de gado, na quantidade de 450 g/vaso de 10 L; T3: Adubação química; T4: 3 kg m⁻² de adubo verde (AV) (150g por vaso de 10 L); T5: 6 kg m⁻² de adubo verde (300 g por vaso de 10 L); T6: 9 kg m⁻² de adubo verde (450g por vaso de 10 L); T7: 12 kg m⁻² de adubo verde (600 g por vaso de 10 L). Foram avaliados peso seco, análise foliar, teores de pigmentos fotossintetizantes, fenólicos totais, flavonóides totais e verbascosídeo; e, teor, rendimento e análise química do óleo essencial. Para o crescimento da biomassa da planta o melhor tratamento foi com uso de 600 g de AV. Para o teor e rendimento do óleo essencial foram as doses 450 e 600 g de AV. Para o verbascosídeo e flavonoides totais foi o tratamento controle. Para os compostos fenólicos os melhores tratamentos foram a adubação química e AV na dose de 300 g. O uso do adubo verde em detrimento da adubação convencional foi positiva para os atributos analisados na espécie de *Lippia dulcis*. Além de ser uma estratégia mais barata e sustentável no cultivo de plantas medicinais.

Palavras chaves: Capim doce. Planta medicinal. Adubação orgânica. Óleo essencial. Verbascosídeo.

ABSTRACT

Lippia dulcis Trevir. (Verbenaceae) is a medicinal plant that has antidiabetic and sweetening potential. It presents in its chemical composition essential and phenolic compounds, including verbascoside. The objective was to evaluate the influence of green manuring with *Crotalaria juncea* on vegetative growth and accumulation of essential oil, total phenolic compounds and verbascoside in *Lippia dulcis*. The experiment was treated in a completely randomized design (CRD), with seven treatments T1: Substrate soil and sand; T2: Fertilization with cattle manure, in the amount of 450 g/10 L pot; T3: Chemical fertilization; T4: 3 kg m⁻² of green manure (150g per 10 L pot); T5: 6 kg m² of green manure (300 g per 10 L pot); T6: 9 kg m² of green manure (450g per 10 L pot); T7: 12 kg m² of green manure (600 g per 10 L pot). Dry weight; leaf analysis; levels of photosynthetic pigments, total phenolics, total flavonoids and verbascoside; and, content, yield and chemical analysis of the essential oil. For the growth of plant biomass, the best treatment was using 600 g of GM. For the essential oil content and yield, were the doses of 450 and 600 g of GM. For verbascoside and total flavonoids it was the control treatment. For phenolic compounds, the best treatments were chemical fertilization and GM at a dose of 300 g. The use of green manure instead of conventional fertilization was positive for the attributes analyzed in the species of *Lippia dulcis*. In addition to being a cheaper and more sustainable strategy in the cultivation of medicinal plants.

Keywords: Sweet grass. Medicinal plant. Organic fertilization. Essential oil. Verbascoside.

1 INTRODUÇÃO

Lippia dulcis Trevir. (Verbenaceae) é uma planta utilizada, há muito tempo, na medicina tradicional mexicana, especialmente, para o tratamento de tosse, resfriado, bronquite, asma, cólica e como emenagogo (COMPADRE; ROBBINS; KINGHORN, 1986). É conhecida na Amazônia brasileira como capim doce, devido ao sabor adocicado do chá de suas folhas. A literatura aponta potencial antimicrobiano (Cáceres et al., 1993); antiproliferativo (ABE et al., 2002); anti-inflamatório (PEREZ et al., 2005); antiespasmódico (Görnemann et al., 2008) e antidiabético (Ruas et al., 2023) para *L. dulcis*, sendo suas propriedades associadas ao óleo essencial ou aos compostos fenólicos, especialmente, verbascosídeo. O dulçor da planta é dado principalmente por um sesquiterpeno bisabolânico presente no óleo essencial, a hernandulcina, um constituinte 1000 vezes mais doce que a sacarose (COMPADRE et al., 1985).

O crescimento e o metabolismo secundário das plantas são influenciados por diversos fatores como manejo, irrigação, nutrição e fertilidade do solo, além do ambiente em que as plantas medicinais se encontram (SILVA et al., 2017). O manejo da fertilidade do solo é fundamental à formação de todas as espécies. Além de ser essencial para o seu crescimento, promove efeitos posteriores à melhoria da produtividade, da qualidade e do estabelecimento de qualquer cultura. Para isso, o conhecimento das exigências nutricionais das espécies, de um modo geral, faz-se necessário (FEITOSA et al., 2011; HUSSAIN et al., 2020).

A adição de nutrientes ao solo é necessária conforme as exigências da planta (TIAN et al., 2020). Dados da literatura apontam que as plantas medicinais respondem muito bem a adubação orgânica, entretanto o tipo de adubo e a dose influenciam sobremaneira no crescimento e na sua composição química (BIBIANO et al., 2019; LOPES et al., 2019; SILVA et al., 2021; MASSEY et al., 2021; HONORATO et al., 2022). À medida que a agricultura orgânica ganha impulso em diversas culturas, este estudo será útil para cultivo de *Lippia dulcis*, a fim de determinar a influência da fertilização química, adubo orgânico e práticas de adubação verde.

Os benefícios da adubação verde na produtividade agrícola e no acúmulo de óleo essencial e timol em *Thymus vulgaris* L. (tomilho), uma planta condimentar e medicinal, foi demonstrada por Honorato et al., 2022. A aplicação de adubos orgânicos e verde melhorou o crescimento, o rendimento, a composição química do óleo essencial e, ainda contribuiu para o

aprimoramento das propriedades físicas do solo e dos custos de produção de *Cymbopogon flexuosus* L. (capim-limão da Índia) (MASSEY et al., 2021).

O uso de adubação verde é uma estratégia importante para melhorar a fertilidade do solo e a produção agrícola sustentável, além de diminuir o custo de produção (LEI et al., 2022). Segundo Marques et al. (2018) o uso dessa técnica para o cultivo de plantas medicinais é recomendado em detrimento da adubação convencional, pois o uso de produtos químicos pode comprometer a composição química da planta.

A *Crotalaria juncea*, é uma das principais espécies utilizada como adubo verde devido a sua rápida taxa de crescimento, alta fixação de nitrogênio, além de ser adaptada a diferentes condições edafoclimáticas (Xavier et al., 2017). Caracteriza-se por possuir tolerância ao estresse hídrico, baixa exigência de fertilidade do solo, além de controlar nematoides e plantas daninhas (Espíndola et al., 2005; Silva et al., 2007; Teodoro et al., 2016; Facco et al., 2018).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito do adubo verde (*Crotalaria juncea*) na produção de biomassa, teor e rendimento do óleo essencial e acúmulo de compostos fenólicos e verbascosídeo em *Lippia dulcis*.

2 MATERIAL E METÓDOS

2.1 Área de estudo

O experimento foi desenvolvido na Universidade Federal de Lavras, no setor de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, no município de Lavras, localizado na região sul de Minas Gerais, a 918,87 m de altitude, 21°14' de latitude sul e 45°00' de longitude oeste.

O município possui uma precipitação média anual de 1529,7 mm e temperatura média anual variando entre 15,8°C no mês mais frio e 22,1°C no mês mais quente e umidade relativa do ar de 76,2% (BRASIL, 1992). O clima se enquadra no tipo Cwa na classificação climática de Köppen e possui duas classificações mais definidas: secas com temperaturas baixas de abril a setembro e chuvosa com temperaturas mais altas de outubro a março (DANTAS; CARVALHO; FERREIRA, 2007).

2.2 Plantio da crotalária

O plantio da crotalária (*Crotalaria juncea*) foi realizado em campo, com um espaçamento de 0,50 cm entre linhas e 0,20 cm entre plantas, no mês de outubro de 2021. A área foi previamente preparada de forma a descompactar o solo para a semeadura. A colheita foi realizada 120 dias após o plantio, quando a crotalária atingiu entre 70 a 80 % de floração, posteriormente foi triturada, incorporada ao solo de cada vaso, em diferentes dosagens, e 30g foi levado para laboratório para análise foliar (Tabela 1).

Tabela 1. Análise foliar da *Crotalaria juncea*

	Macronutrientes						Micronutrientes				
	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	(g kg ⁻¹)						(mg kg ⁻¹)				
Crotalária juncea	34,5	1,9	9,9	11,2	3,2	2,1	24,9	6,3	655,1	50,5	34,3

2.3 Obtenção do material vegetal de *Lippia dulcis*

A excicata de *Lippia dulcis* foi confeccionada a partir da planta matriz cultivada em canteiro no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura, e depositada no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e está sob o registro 58940.

As mudas de *Lippia dulcis* foram produzidas a partir de plântulas cultivadas in vitro, em meio MS e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h luz/ 8h escuro, sob intensidade luminosa de 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de 26+1 °C, por 30 dias. Posteriormente, as plântulas foram aclimatizadas em bandejas de 128 células, contendo o substrato comercial e mantidas em estufa com 60% de sombreamento. Após 20 dias, as mudas foram transplantadas para vasos de plástico com capacidade de 10 litros, contendo uma planta por vaso. O adubo verde (*Crotalaria juncea*) foi incorporado ao substrato 15 dias antes do plantio das mudas. O substrato utilizado foi composto por solo, do tipo subsolo horizonte B (latossolo vermelho distrófico) e areia, na proporção 1:1 (v/v), acrescido de quatro doses diferente de adubação verde com crotalária (3, 6, 9 e 12 Kg/m²). Para fins de comparação foram implementados os seguintes tratamentos controle: apenas terra: areia na proporção 1:1;

adubação com esterco bovino (450g/vaso de 10 L) e adubação química seguindo a metodologia descrita por Malavolta (1997). A dose (ppm) de adubação química usada foi de: N - 300, P - 200, K - 150, Ca - 75, S - 50, Mg - 15, Zn - 5, Fe - 5, Cu - 1,5, B - 0,5, Mo - 0,1. As fontes utilizadas foram uréia (45% N), superfosfato simples (18% P₂O₅; 18% Ca; 11% S) e cloreto de potássio (58% K₂O), os demais elementos listados anteriormente foram adicionados usando reagentes de grau analítico. A irrigação foi realizada três vezes por semana para manter a capacidade de campo. Os tratamentos experimentais estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos do experimento de adubação verde em plantas de *Lippia dulcis*.

Tratamentos	Descrição
T1	Controle: Substrato terra e areia (CTA)
T2	Controle: Adubação com esterco de gado, na quantidade 450 g/vaso de 10 litros
T3	Controle: Adubação química (Malavolta, 1997)
T4	3 kg/m ² de adubo verde (150g por vaso de 10 litros)
T5	6 kg/m ² de adubo verde (300g por vaso de 10 litros)
T6	9 kg/m ² de adubo verde (450g por vaso de 10 litros)
T7	12 kg/m ² de adubo verde (600g por vaso de 10 litros)

Fonte: Da autora (2023).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos, quatro repetições e quatro vasos por repetição, totalizando 112 vasos.

Após 90 dias do transplântio das mudas as folhas, flores e raízes de *Lippia dulcis* foram colhidas e as seguintes variáveis analisadas: peso seco das folhas, caule, raiz, flores e total, nutrientes foliares; conteúdos de clorofila *a*, clorofila *b*, total, carotenoides, teor e rendimento do óleo essencial, fenóis totais, flavonoides totais e quantificação do verbascosídeo.

2.4 Avaliações

2.4.1 Acúmulo de biomassa

Para obtenção do peso seco, cada parte da planta foi separada em folhas, caule, raízes e flores e submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada a 50 °C, até o peso constante. Posteriormente, utilizando uma balança semianalítica foi obtido os pesos secos das folhas (PSF), da flor (PSFL), do caule (PSC), da raiz (PSR) e total (PST), expressos em g planta⁻¹.

2.4.2 Teores de pigmentos fotossintetizantes

O conteúdo de fotossintatos foi extraído e analisado de acordo com o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979). As folhas foram coletadas entre o terceiro e quarto nó caulinar e transportadas em um recipiente fechado para evitar incidência de luz e, conseqüentemente, a degradação da clorofila.

Folhas frescas (50 mg) de *Lippia dulcis* foram pesadas diretamente em tubos de Falcon cobertos com papel alumínio e incubadas com 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e, mantidos em estufa a 65 °C por 24 h. As amostras foram preparadas em triplicatas. Posteriormente, foi transferido três alíquotas de 3 mL de cada réplica para uma cubeta de quartzo, e os valores de densidade óptica em 480, 649 e 665 nm foram lidos em espectrofotômetro TECAN INFINITE M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control® (versão 3.37), contra DMSO em branco. O valor de densidade óptica específica de cada amostra foi calculado pela média das leituras das três alíquotas.

Os comprimentos de onda e as equações utilizadas para os cálculos foram baseados na metodologia de Wellburn (1994), sendo:

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

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

$$\text{Carotenoides}_{480} = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times Ca - 53,78 \times Cb)/220.$$

A clorofila total ($a + b$) foi calculada pelo somatório dos resultados encontrados das equações para clorofila a e b, sendo todos os resultados expressos em mg g^{-1} de folha fresca.

2.4.3 Análise foliar

Três gramas de folhas secas de cada tratamento foram enviados ao Laboratório de Análises Agropecuárias 3rlab – Lavras/MG-Brasil, para determinar o conteúdo de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Mn, Zn e Fe. Sendo os macronutrientes expressos em g/Kg de peso seco de folha e os micronutrientes em mg/Kg de peso seco de folha. Com os dados de peso médio de folha por planta foram calculados os acúmulos dos macronutrientes e micronutrientes.

2.4.4 Teor, rendimento e análises químicas do óleo essencial

Amostras de 20g de folhas secas de *Lippis dulcis*, desidratadas conforme o item 2.4.1, foram hidrodestiladas com 1,0 L de água por 90 minutos em um aparelho Clevenger modificado.

O hidrolato foi recolhido e, o óleo essencial purificado por partição líquido-líquido com diclorometano (15 mL). A fração orgânica foi reunida e tratada com sulfato de magnésio anidro, seguida de filtração simples e evaporação do solvente orgânico em capela de exaustão de gases a temperatura ambiente. O óleo essencial foi pesado e armazenado em frascos âmbar hermeticamente fechados e mantidos em geladeira a 4°C, até as análises químicas.

O teor e o rendimento do óleo essencial das folhas foram calculados, sendo o teor do óleo essencial expresso em % (g.100 g de matéria seca⁻¹ das folhas) e o rendimento em mg.planta⁻¹, empregando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Teor do óleo (\%)} = ((\text{massa do óleo (g)} / \text{MSF (g)}) \times 100)$$

MSF: Quantidade de matéria seca das folhas utilizadas na destilação.

$$\text{Rendimento (g. planta}^{-1}\text{)} = (\text{Teor de óleo (\%)} \times \text{MSFP (g)}) / 100$$

MSFP: Matéria seca das folhas de uma planta.

As análises químicas por cromatografia gasosa foram realizadas conforme GERMANO et al. (2022). Em síntese as temperaturas do injetor e do detector foram programadas a 250 °C e nas condições do forno empregou-se uma rampa de temperatura de 3 °C min⁻¹ de 60 a 240°C, seguida por outra rampa de 10 °C min⁻¹ até 280°C. O equipamento, as demais condições de análise e as identificações dos constituintes químicos nas amostras do óleo essencial foram exatamente iguais às relatadas por GERMANO et al. (2022), incluindo as concentrações dos analitos que foram expressas como a média da porcentagem da área relativa normalizada para os picos cromatográficos \pm o desvio-padrão. As análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$).

2.4.5 Análises químicas dos compostos fenólicos

2.4.5.1 Preparo das amostras

O preparo dos extratos seguiu a metodologia descrita por Deb e Sakar (2021). Folhas de *Lippia dulcis* pulverizadas e passadas por um tamis 20 mesh (850 μm) foram extraídas por refluxo por 20 minutos com metanol 50%. O extrato (10% p/v) foi filtrado à vácuo e concentrado em rotavapor a 40 °C. Os extratos concentrados foram mantidos em geladeira a 4°C, até às análises químicas.

Para o doseamento de fenóis e flavonóides totais, as amostras foram preparadas pela diluição do extrato concentrado em etanol 50% na concentração de 50 mg mL⁻¹.

Para a quantificação de verbascosídeo 5 mg do extrato concentrado foi pesado diretamente em microtubo, ressuspenso em 1mL de água ultrapura, sonificado por 2 minutos e, em seguida, centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi injetado automaticamente no cromatógrafo.

2.4.5.2 Fenóis totais

A quantificação de fenóis totais foi determinada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, seguindo o método de Slinkard e Singleton (1977). Em cada poço da microplaca foi adicionado 20 μL da amostra, 120 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (10% v/v) e 120 μL de carbonato de sódio (7% p/v). Após 2 h de reação à temperatura ambiente e no escuro, a absorbância foi medida a 760 nm.

A curva de calibração foi gerada a partir do padrão de ácido gálico na faixa de concentração de 0,008 a 0,5 mg mL⁻¹ de água destilada ($y = 15,627x + 0.0537$ $R^2 = 0,9919$). Os resultados foram expressos em mg Equivalente de Ácido Gálico (EAG). g de folha seca⁻¹.

2.4.5.3 Flavonoides totais

A determinação do conteúdo total de flavonoides foi conforme descrito por Ahn. et al. (2007). Em microplacas foram adicionados 100 μL do extrato hidroetanólica a 50% das folhas em uma concentração de 50 mg mL⁻¹, em seguida foi acrescentado 100 μL de solução de cloreto de alumínio (10% p/v). O branco foi preparado

utilizando 100 µL da amostra e 100 µL de álcool 70%. Após 40 minutos, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em uma absorbância de 420 nm

A curva de calibração foi gerada a partir do padrão de quercetina na faixa de concentração de 0,008 a 0,12 mg mL⁻¹ álcool 70% ($y = 20,591x + 0,1185$ $R^2 = 0,9917$). Os resultados foram apresentados como mg Equivalente de Quercetina (EQ). g de folha seca⁻¹.

2.4.5.4 Análises químicas de verbascosídeo por CLAE-FR

As análises químicas de verbascosídeo foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida Agilent 1200 Series (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha), equipado com bomba quaternária (G1311A), sistema de degasificação (G13222A), amostrador automático ALS (G1322A) e detector ultravioleta de comprimento de onda variável (G1315D), conectado ao computador com sistema controlado pelo *software* EzChrom, versão OpenLAB versão A07.04, build 04.07.28. As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa C18 (Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies®, EUA) com um empacotamento à base de sílica (150 mm × 4,6 mm d.i., 5 µm) e pré-coluna (12,5 mm × 4,6 mm D.I., 5 µm). Utilizou-se água (A) e acetonitrila (B) como eluentes, ambos contendo 0,1% (v/v) de ácido fosfórico. A condição de eluição inicial foi de 90% A e 10 % B, seguido de gradiente linear de 8 min até 70% A e 30% de B e de 2 min de 40% A e 60% de B e mais 2 min de gradiente linear de 10% A e 90% B, mantendo-se condição isocrática, por 2 min e retornando a condição inicial. As análises foram realizadas a 30 °C, com detecção no comprimento de onda de 320 nm e volume de injeção de amostras de 10 µL, a taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

A presença de verbascosídeo nas amostras foi caracterizada por comparação dos tempos de retenção comparados com padrão autêntico de verbascosídeo (Sigma-Aldrich; 86,03% de pureza) analisadas nas mesmas condições, co-injeção com a substância de referência e pela homogeneidade espectral do pico da verbascosídeo na amostra comparado ao da substância de referência a 320 nm.

A quantificação do verbascosídeo, nas amostras, baseou-se no método do padrão externo (RIBANI et al., 2004). Para a construção da curva analítica de verbascosídeo visando avaliar a linearidade do método, fez-se necessário estimar inicialmente a faixa de concentração dessa substância no extrato de folhas secas de *Lippia dulcis*. As estimativas foram baseadas nas áreas relativas do pico correspondente ao verbascosídeo nas amostras e a partir de uma solução

de referência com concentração de $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$. A linearidade do método foi determinada a partir de duas curvas analíticas construídas com cinco pontos e cada ponto das curvas foi obtido por injeção em triplicata de diferentes volumes (4 a 14 μL) de uma solução de verbascosídeo de referência a $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$, como indicado na Tabela 3. As curvas analíticas foram determinadas em relação a massa injetada de verbascosídeo.

Os dados obtidos para cada curva de calibração foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (R^2) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos dois dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de covariância ($p < 0,05$) no *software* Graph Pad Prism 6. Os teores de verbascosídeo foram expressos em mg por grama de extrato (mg g^{-1}).

Tabela 3. Correspondência entre volumes e as massas injetadas para a construção das curvas analíticas de verbascosídeo. Lavras, UFLA, 2023.

Volume de injeção (μL)	Massa de injeção (μg)
Solução 1 (1mg/ml)	
14	14
10	10
8	8
6	6
4	4

Fonte: Da autora (2023)

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados quanto a sua homogeneidade e posteriormente realizou-se a análise de variância (ANOVA). Foi realizada a análise de regressão em nível de 5% de probabilidade de erro para análise da biomassa, e o teste de Dunnet à 5% de probabilidade de erro para comparar as doses de adubo verde com adubação orgânica e química. O teste de Scott Knot, em nível de 5% de probabilidade de erro, para as demais variáveis, por meio do software SISVAR® (FERREIRA, 2014).

Foi realizada uma rede de correlações bidimensional para verificar a correlação entre as variáveis analisadas neste trabalho. As correlações positivas foram apresentadas em azul, enquanto as correlações negativas foram apresentadas em vermelho. A análise de componentes principais (PCA) foi usada para classificar os tratamentos e identificar as adubações que mais contribuíram para a variação dos dados. Essas duas últimas análises foram realizadas no software R.

4 RESULTADOS

4.1 Acúmulo de biomassa

Ao comparar o acúmulo de peso seco entre os tratamentos com o adubo verde e o esterco bovino (Tabela 4), este foi superior para todas as variáveis analisadas. Com exceção do peso seco da raiz, os acúmulos de matéria seca nos demais órgãos de *Lippia dulcis* foram cerca de 2 vezes maiores que na maior dose de adubo verde utilizada (600 g/vaso). Entretanto, ao comparar o acúmulo de biomassa da adubação química (Tabela 5) àquelas da adubação verde, esta última se mostrou superior nas doses de 450 g/vaso para peso seco das folhas, flores e raiz e na dose de 600 g/vaso para PSF.

Tabela 4. Médias observadas para pesos secos da folha (PSF), da flor (PSFL), da raiz (PSR), do caule (PSC) e total (PST) para diferentes doses em adubação verde e esterco bovino em plantas de *Lippia dulcis*.

Adubação (g/vaso)	PSF (g)	PSFL (g)	PSR (g)	PSC (g)	PST (g)
Controle	2,43*	0,36*	2,87*	1,53*	7,19*
Verde (150)	3,91*	0,80*	3,52*	2,42*	10,66*
Verde (300)	4,72*	1,10*	5,02*	3,76*	14,61*
Verde (450)	6,92*	1,67*	6,46*	5,21*	20,26*
Verde (600)	6,68*	1,47*	6,74*	5,36*	20,26*
Esterco bovino (450)	16,91	2,77	8,48	10,81	38,97

Médias seguidas de * apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento Adubação Orgânica, pelo Teste Dunnett a 5% de probabilidade do erro. **Controle:** substrato terra:areia 1:1.

Tabela 5. Médias observadas para pesos secos da folha (PSF), da flor (PSFL), da raiz (PSR), do caule (PSC) e total (PST) para diferentes doses em adubação verde e adubação química em plantas de *Lippia dulcis*.

Adubação (g/vaso)	PSF (g)	PSFL (g)	PSR (g)	PSC (g)	PST (g)
Controle	2,43*	0,36*	2,87*	1,53*	7,19*
Verde (150)	3,91*	0,80*	3,52*	2,42*	10,66*
Verde (300)	4,72 ^{ns}	1,10*	5,02*	3,76*	14,61*
Verde (450)	6,92*	1,67*	6,46*	5,21 ^{ns}	20,26 ^{ns}
Verde (600)	6,68*	1,47 ^{ns}	6,74 ^{ns}	5,36 ^{ns}	20,26 ^{ns}
Adubação Química	5,08	1,42	7,28	5,17	18,96

Médias seguidas de * apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento Adubação Química, e médias seguidas de ns não apresentaram diferença significativa com o tratamento Adubação Química, pelo Teste Dunnett a 5% de probabilidade do erro. **Controle:** substrato terra:areia 1:1.

As plantas de *Lippia dulcis* responderam positivamente ao acúmulo de biomassa com o aumento das doses de adubação verde (Figura 1). Conforme pode ser observado na Figura 2, as curvas de regressão de todas as variáveis indicaram aumentos significativos conforme o aumento das doses de adubo verde.

No que se refere ao PSF (Figura 2A), a adubação verde com 450 e 600 g/vaso proporcionou um aumento aproximado de cerca de 175% das folhas de *Lippia dulcis* em relação ao controle. O incremento no peso seco das flores (Figura 2B) na dose de 450 g/vaso de adubo verde foi cerca de 364% maior em relação as plantas sem o adubo. Foi observado também que ao utilizar a maior dose do adubo verde, as flores tiveram uma tendência de queda na sua produção.

A aplicação da crotalária na dose de 600g/vaso proporcionou um aumento de 251%, 124% e 181% nos pesos secos de caule, raiz e total, respectivamente, em relação ao controle (Figuras 2C, 2D e 2E). Na dose de 600 e 450g/vaso, não houve diferença significativa na produção de biomassa.

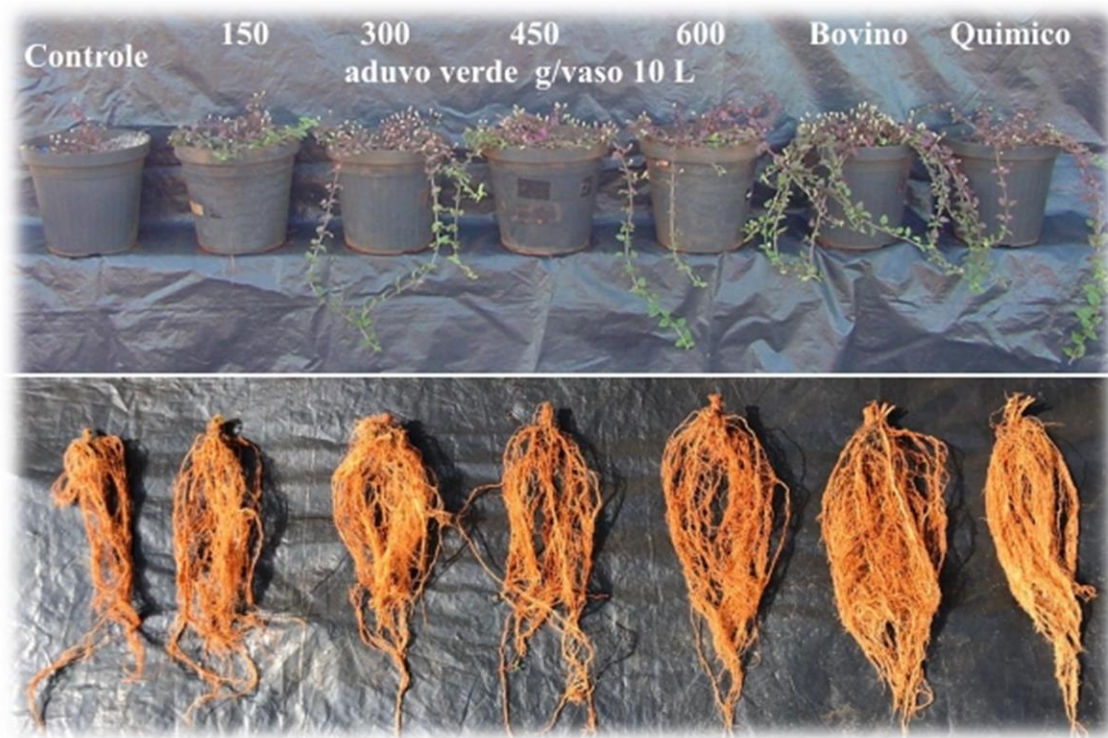


Figura 1. Plantas e raízes de *Lippia dulcis* cultivadas sob diferentes tipos de adubação.

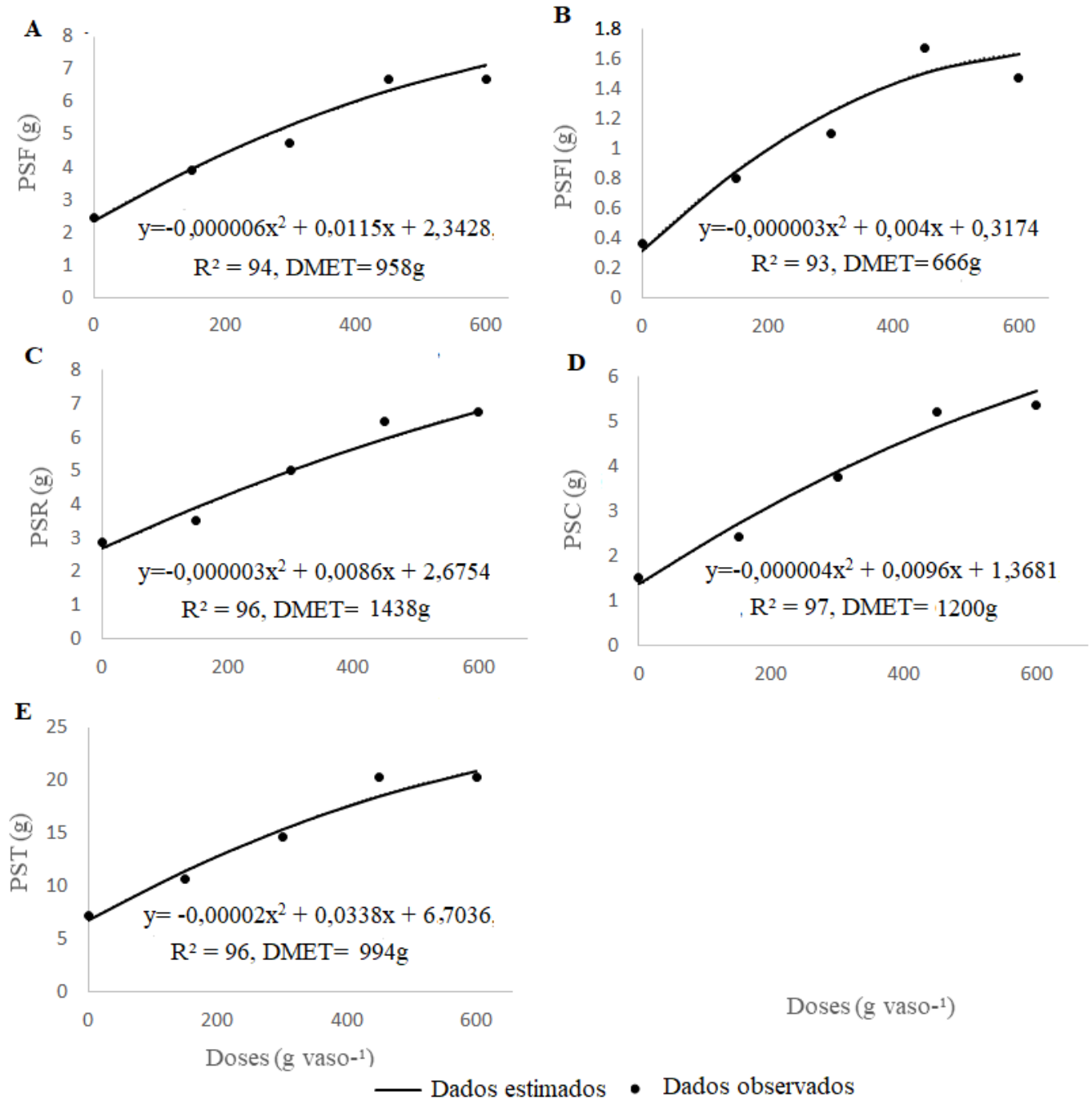


Figura 2. Peso seco da folha (A), flor (B), caule (C), raiz (D); e total (E) de *Lippia dulcis* cultivadas com diferentes doses de adubo verde (*Crotalaria juncea*).

4.2 Teores de pigmentos fotossintetizantes

Os tratamentos com esterco bovino e adubação verde nas doses de 150 e 300 g/vaso acumularam os maiores teores de pigmentos fotossintetizantes, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre si (Tabela 6). Já os tratamentos com adubação verde nas doses de 450 e 600 g/vaso não apresentaram diferenças significativas entre si e à adubação química e o controle no acúmulo dos pigmentos fotossintéticos.

Tabela 6. Efeito de doses de adubo verde (*Crotalaria juncea*), adubação química e esterco bovino sobre os pigmentos fotossintéticos de *Lippia dulcis*.

Pigmentos fotossintetizantes				
Adubação (g/vaso)	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila Total	Carotenoides
(mg. g ⁻¹ MF)				
Controle	0.366b	0.145b	0.512b	0.151b
Verde (150)	0.533a	0.185a	0.718a	0.188a
Verde (300)	0.552a	0.168a	0.720a	0.178a
Verde (450)	0.442b	0.149b	0.591b	0.155b
Verde (600)	0.328b	0.122b	0.451b	0.138b
Esterco bovino (450)	0.625a	0.191a	0.816a	0.190a
Adubação Química	0.423b	0.166a	0.589b	0.162b
CV (%)	15,26	10,77	13,62	8,44

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não se diferenciaram entre si, pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro. **Controle:** substrato terra:areia 1:1.

Os resultados obtidos para as análises foliares das plantas de *Lippia dulcis* se encontram na Tabela 7. Os tratamentos que tiveram um maior acúmulo de N foram os tratamentos com 150 e 300 gramas de adubos verde e com adubação orgânica, 14.1, 14.7 e 14.5 g.kg⁻¹, respectivamente.

Tabela 7. Acúmulo de macronutrientes e micronutrientes na parte aérea de *Lippia dulcis* cultivadas com adubação verde (*Crotalaria juncea*), esterco bovino e adubação química.

Adubação (g/vaso)	Macronutrientes						Micronutrientes				
	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	(g kg ⁻¹)						(mg kg ⁻¹)				
Controle*	13,7	1,6	17,0	12,5	2,0	2,3	45,1	14,9	1004,8	57,7	20,0
Verde (150)	14,1	1,9	17,1	11,1	2,0	2,3	42,3	15,2	864,1	47,5	22,5
Verde (300)	14,7	1,7	16,8	11,5	2,1	2,5	47,8	15,0	896,8	42,8	25,6
Verde (450)	13,5	1,9	17,1	13,2	2,4	2,8	52,5	13,5	732,4	44,3	26,8
Verde (600)	13,9	1,9	16,0	11,2	2,2	2,6	44,3	15,2	639,7	37,7	35,4
Esterco bovino (450)	14,5	1,7	14,8	7,9	2,5	2,6	37,4	10,0	423,7	39,9	21,7
Adubação Química	12,9	2,1	18,0	14,1	1,8	2,3	50,1	14,2	896,5	55,6	19,7

***Controle:** substrato terra:areia 1:1

4.3 Teor, rendimento e análises químicas do óleo essencial

As plantas de *Lippia dulcis* responderam positivamente à adubação verde quanto a produção de óleo essencial. A Tabela 8 mostra os resultados do teor e do rendimento do óleo. Notou-se que as plantas adubadas com 150, 450 e 600 g/vaso com crotalária acumularam os maiores teores de óleo essencial. No entanto, o rendimento que expressa o conteúdo de óleo essencial em função da produção vegetal indicou os melhores resultados para as doses de 450 e 600 g/vaso de crotalária. Os tratamentos controle, adubação verde na dose 300 g/vaso, esterco bovino e adubação química não diferiram entre si quanto ao teor de óleo essencial. Com relação ao rendimento as adubações orgânica e química apresentaram médias inferiores quando comparadas com as adubações verde nas doses de 450 e 600 g/vaso. Já o controle e a dose 300 g/vaso de adubo verde obtiveram as menores médias, ambas com 0,003 g OE/planta.

Tabela 8. Efeito de doses de adubo verde (*Crotalaria juncea*), adubação química e esterco bovino sobre o teor e rendimento do óleo essencial de *Lippia dulcis*.

Adubação (g/vaso)	Óleo essencial	
	Teor (%)	Rendimento (g. planta ⁻¹)
Controle	0.133b	0.003d
Verde (150)	0.200a	0.006c
Verde (300)	0.067b	0.003d
Verde (450)	0.233a	0.016a
Verde (600)	0.222a	0.015a
Esterco bovino (450)	0.067b	0.011b
Adubação Química	0.100b	0.006c
CV (%)	23,360	16,090

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não se diferenciaram entre si, pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O controle e as adubações influenciaram a composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial (Tabela 9). Na composição qualitativa observou-se a presença de 33 a 36 constituintes químicos. O tratamento controle foi o que apresentou o menor número de constituintes, pois nestas amostras não foram detectados o β -copaeno, o sesquisabineno e o (*Z*)- α -bisaboleno, que conforme o tipo ou dose de adubação verde também estavam ausentes. No que tange a análise quantitativa, o óleo essencial de *L. dulcis* constituiu majoritariamente de sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados, principalmente de esqueletos bisabolano e cadinano. Independentemente do tipo de adubação ou dose de adubo verde, os sesquiterpenos bisabolânicos, α -bisabolol e hernandulcina, foram os constituintes que apresentaram maiores concentrações no óleo essencial de *Lippia dulcis*.

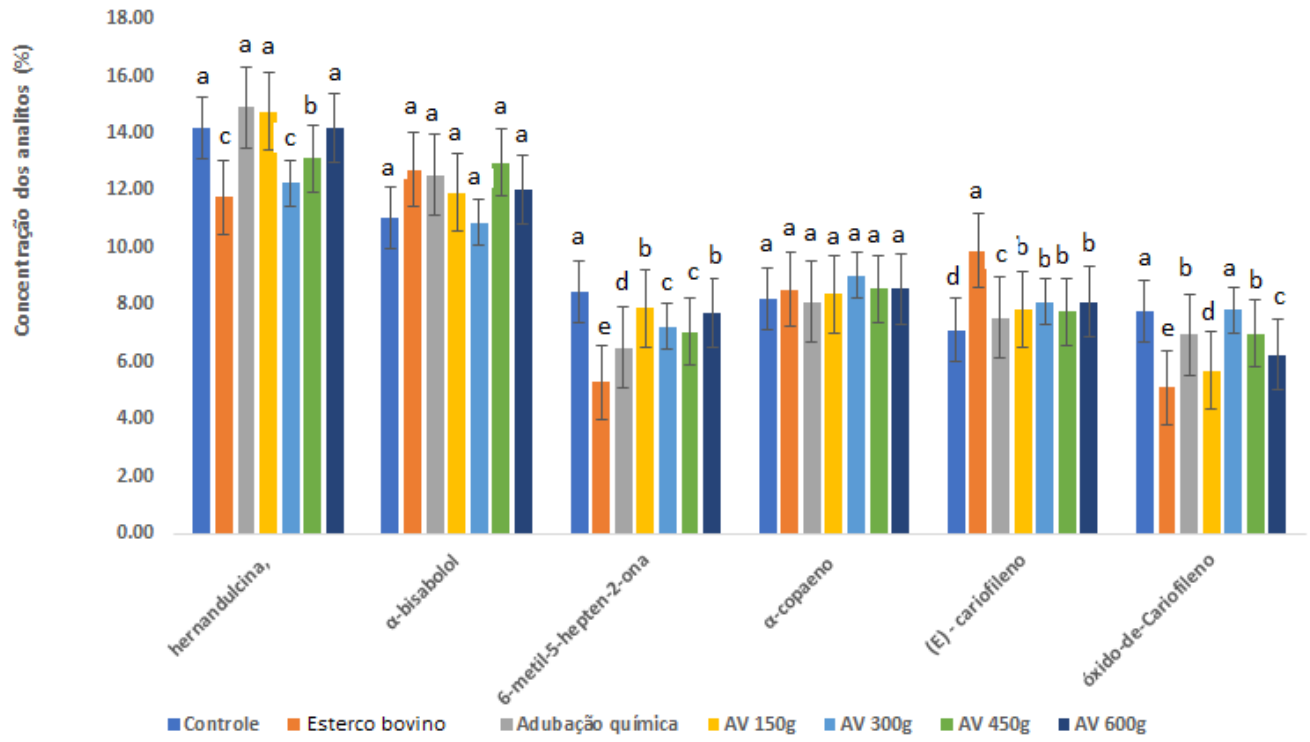
Com o propósito de verificar se ocorreu diferença estatística do manejo agrônomico, os constituintes químicos que independente do tratamento tiveram áreas superiores a 5% foram submetidos a análise de variância e teste de médias de Scott Knott à 5 % de probabilidade e os dados estão apresentados na Figura 2. Os constituintes foram a hernandulcina, o α -bisabolol, a 6-metil-5-hepten-2-ona, o α -copaeno, o (*E*)-cariofileno e o óxido de cariofileno, utilizado (Figura 3). Não houve diferença estatística entre os tratamentos para o α -bisabolol e o α -copaeno. Para a hernandulcina o tratamento controle, adubação química e adubação verde nas doses de 150g e 600g apresentaram médias superiores aos demais tratamentos, sendo o esterco bovino e a adubação verde na dose de 300g os tratamentos com menores teores desse constituinte. O maior teor de 6-metil-5-hepten-2-ona ocorreu no tratamento controle, e o menor na adubação orgânica. Já as maiores médias nos tratamentos controle e adubação verde na dose de 300g e a menor no tratamento com esterco bovino.

Tabela 9.Constituintes químicos do óleo essencial de *Ld*, cultivado com AV, EB e AQ.

Constituintes	IR	Controle	EB	AQ	g/vaso AV			
					150	300	450	600
1-Octen-3-ol	976	0,73	0,58	0,41	0,88	0,94	0,84	0,82
6-Metil-5-hepten-2-ona	986	8,46	5,29	6,50	7,87	7,24	7,04	7,71
3-Metil-2-ciclohexen-1-ona	1052	4,16	3,33	4,36	4,36	3,38	3,51	3,93
Linalool	1100	2,36	3,02	1,87	2,34	3,14	2,76	2,83
Citronellol	1229	0,43	0,52	0,38	0,52	0,51	0,52	0,44
Neral	1241	0,29	0,49	0,28	0,35	0,40	0,45	0,38
Geranial	1270	0,35	0,60	0,38	0,44	0,49	0,54	0,46
α -Copaeno	1372	8,22	8,54	8,10	8,38	9,02	8,56	8,55
β -Bourboneno	1381	2,40	2,62	2,29	2,21	2,73	2,53	2,57
(<i>E</i>)-Cariofileno	1415	7,13	9,90	7,54	7,84	8,09	7,74	8,11
β -Copaeno	1424	nd	0,28	nd	nd	0,25	nd	nd
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1433	0,39	0,52	0,43	0,45	0,48	0,49	0,46
(<i>Z</i>)- β -Farneseno	1441	0,44	0,54	0,45	0,46	0,50	0,47	0,49
α -Humuleno	1448	0,39	0,51	0,41	0,45	0,44	0,41	0,42
allo-Aromadendrene	1455	3,66	0,93	1,84	0,75	0,83	0,70	0,78
Sesquisabineno	1457	nd	0,61	0,27	0,35	0,26	0,32	0,36
(<i>E</i>)- β -Farneseno	1468	0,68	0,99	0,77	0,53	0,84	0,78	0,89
Dehidrosesquicineol	1473	0,80	0,86	0,82	0,78	0,91	0,87	0,85
γ -Muuroleno	1476	1,41	3,49	1,89	2,26	1,75	1,73	1,81
Biclogermacreno	1492	1,97	3,60	2,56	2,79	2,00	2,09	2,05
α -Muuroleno	1497	1,27	1,41	1,32	1,31	1,41	1,35	1,34
β -Bisaboleno	1507	1,47	2,10	1,66	1,66	1,71	1,65	1,71
γ -Cadineno	1512	0,80	0,77	0,67	0,64	0,99	0,79	0,59
δ -Cadineno	1521	4,54	6,22	5,22	5,50	4,99	4,95	5,05
α -Calacoreno	1539	0,43	0,27	0,51	0,39	0,51	0,52	0,45
(<i>Z</i>)- α -Bisaboleno	1541	nd	0,29	nd	0,25	0,21	nd	nd
<i>cis</i> -Nerolidol	1564	1,65	1,99	1,65	1,81	1,88	1,90	1,69
Espatuleno	1574	4,71	4,60	5,01	4,55	5,29	5,26	4,82
Óxido de cariofileno	1579	7,79	5,10	6,97	5,69	7,82	7,00	6,26
β -Atlantol	1608	0,20	2,74	0,19	0,17	0,22	0,21	0,20
α -Muurulol	1635	0,23	0,30	0,28	0,26	0,27	0,29	0,24
<i>cis</i> -Calemeneno-10-ol	1660	0,53	0,43	0,50	0,57	0,40	0,51	0,52
α -Bisabolol	1684	11,04	12,72	12,55	11,92	10,87	12,97	12,03
Isômero relacionado a hernandulcina	1752	1,17	1,14	1,32	1,32	1,22	1,29	1,26
Hernandulcina	1851	14,18	11,76	14,91	14,75	12,25	13,11	14,42
<i>epi</i> -Hernandulcina	1862	1,04	0,80	1,06	1,03	0,80	0,81	1,00
Outros		13,34	9,20	11,26	13,11	11,55	11,39	12,46
Monoterpenos oxigenados		3,43	4,62	2,92	3,64	4,55	4,28	4,11
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		35,20	43,58	35,94	36,19	36,99	35,07	35,62
Sesquiterpenos oxigenados		43,32	42,45	45,24	42,83	41,92	44,22	43,28
Total		95,29	99,85	95,35	95,77	95,01	94,96	95,46
Número de constituintes		33	36	34	35	36	34	36

IR: Índice de retenção linear relativo a série n-alcenos (C8-C20) em coluna HP-5MS na ordem de eluição, *Ld*: *Lippia dulcis* EB: Esterco bovino, AQ: Adubação química, AV: Adubação verde, nd: Não detectado

Figura 3. Comparação estatísticas de 6 principais substâncias do óleo essencial das folhas de *Lippia dulcis*, cultivada com diferentes tipos de adubação.



Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não se diferenciaram entre si, pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4.4 Compostos fenólicos

Conforme se observa na Tabela 10, os tratamentos com adubação química e adubação verde na dose de 300 g/vaso acumularam os maiores teores de fenóis totais, não apresentando diferenças significativas entre si. Os tratamentos com as maiores doses de adubo verde 450 e 600 g/vaso acumularam os menores conteúdos de fenóis totais, sendo estatisticamente iguais entre si. Para os flavonoides totais todos os tratamentos diferiram estatisticamente entre si, onde o controle teve o maior acúmulo, decrescendo na seguinte ordem: adubação química, esterco bovino e das adubações verde nas doses de 600, 300, 450 e 150 g/vaso.

Tabela 10. Efeito de doses de adubo verde (*Crotalaria juncea* L.), adubação química e esterco bovino sobre fenóis e flavonoides totais e verbascosídeo em plantas de *Lippia dulcis* Trev.

Compostos fenólicos			
Adubação (g/vaso)	Fenóis totais (mg EAG g ⁻¹)	Flavonoide totais (mg EQ g ⁻¹)	Verbascosídeo (mg g ⁻¹ extrato)
Controle	145.1b	7.8a	257.9a
Verde (150)	142.3b	3.3g	173.3f
Verde (300)	149.3a	3.9e	198.0e
Verde (450)	133.1c	3.7f	201.7d
Verde (600)	129.1c	4.4d	208.4c
Esterco bovino (450)	119.8d	4.9c	158.7g
Adubação Química	154.9a	5.3b	227.0b
CV (%)	3,88	2,15	0.59

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não se diferenciaram entre si, pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$). **Fenóis totais:** expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g de folha fresca (mg GAE g⁻¹). **Flavonóides totais:** expressos em mg de equivalentes de quercetina/g de folha fresca (QE mg g⁻¹).

As amostras de *Lippia dulcis* também foram avaliadas quanto ao seu teor de verbascosídeo. Para isto, inicialmente foi necessário caracterizar a presença dessa substância nas amostras que foram realizadas por cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-FR) a partir da comparação dos tempos de retenção, espectros no UV e co-injeção com verbascosídeo de referência. A Figura 4 ilustra a presença de verbascosídeo na amostra pela sobreposição dos tempos de retenção da amostra, do padrão e da co-injeção em 9,26 min. Além disso, a presença do verbascosídeo e a seletividade do seu pico foram asseguradas pela homogeneidade espectral dos picos da amostra e do padrão nas bases ascendente e descendente dos picos determinadas a 320 nm.

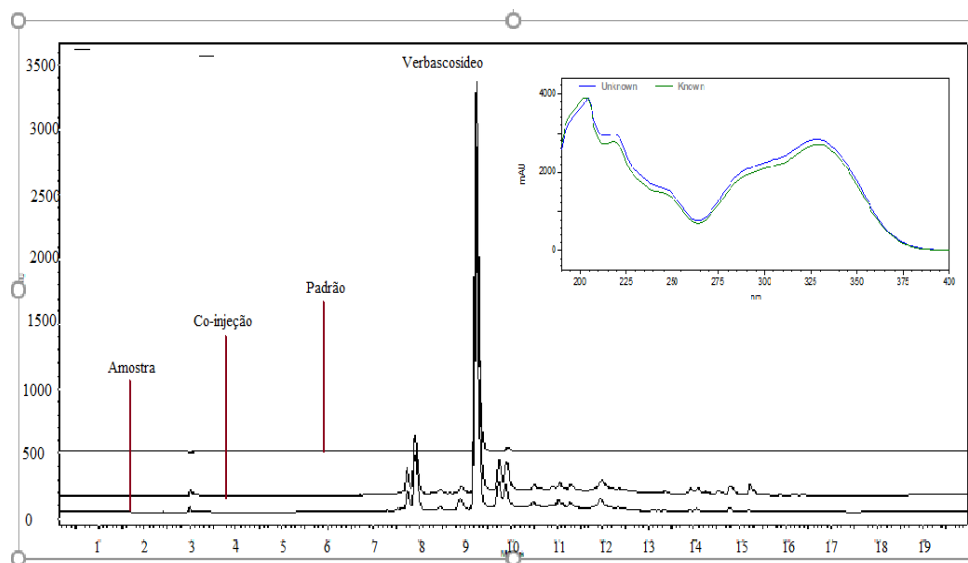


Figura 4. Cromatogramas obtido por CLAE-DAD para uma amostra de *Lippia dulcis*, verbascosídeo de referência e co-injeção com padrão. **Condição cromatográfica:** vide Parte Experimental, item 2.4.5.4. Os espectros no UV correspondem a extração na base ascendente e descendente do pico atribuído ao verbascosídeo obtidos on-line a 320 nm.

A linearidade do método foi determinada por duas curvas analíticas, em dois dias consecutivos. A tabela 11 apresenta os valores de massa injetada e suas respectivas áreas e desvio padrão relativo para cada ponto da curva, nos dois dias análises.

Tabela 11. Massa injetada, área média ($n=3$) e desvio padrão relativo das curvas analíticas construídas a partir de duas soluções de verbascosídeo a 1 mg mL^{-1} , nos dois dias de análise. Lavras, UFLA 2023.

Volume injetado (μL)	Massa injetada (μg)	Dia 1		Dia 2	
		Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)
14	14	38864263	0,39	38444008	0,15
10	10	28666003	0,18	28082365	0,14
8	8	23008652	0,07	22559791	0,15
6	6	17307108	0,10	16973003	0,45
4	4	11598818	0,35	11380024	0,15

Ambas as curvas analíticas construídas indicaram relação linear entre a massa injetada de verbascosídeo (μg) versus as áreas do pico correspondente, sendo obtidos coeficientes de determinação (R^2) com valores superiores a 0,9994 (BERTOLUCCI et al., 2009). Os dados da análise de regressão linear, dos dois dias de análises, e as curvas analíticas obtidas pela média das duas curvas do verbascosídeo estão apresentados nas Figura 5 e Tabela 12, respectivamente. As curvas de calibração obtidas nos dois dias consecutivos foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

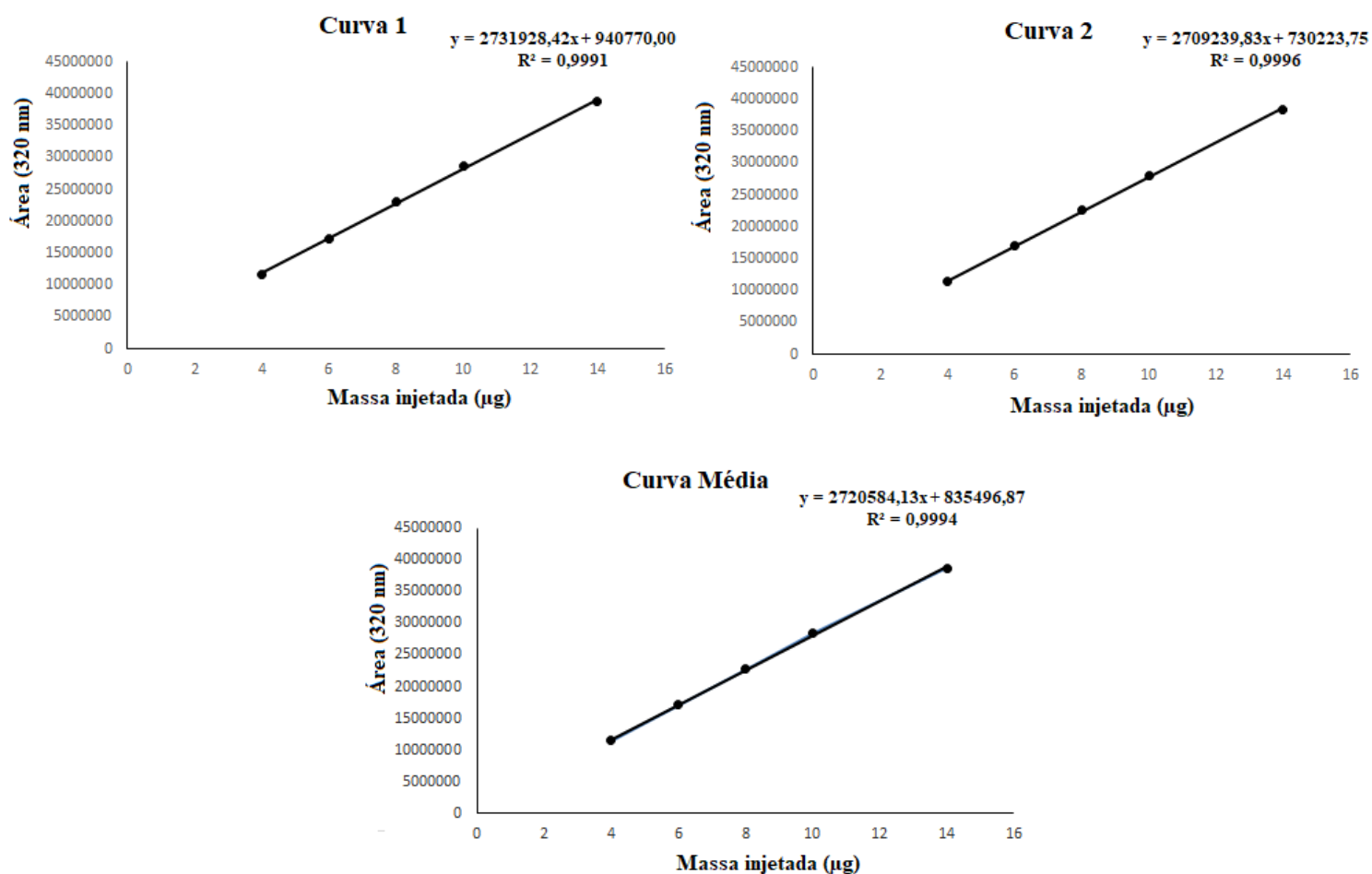


Figura 5. Curvas analíticas e média obtidas por CLAE-FR, em dois dias consecutivos para o verbascosídeo.

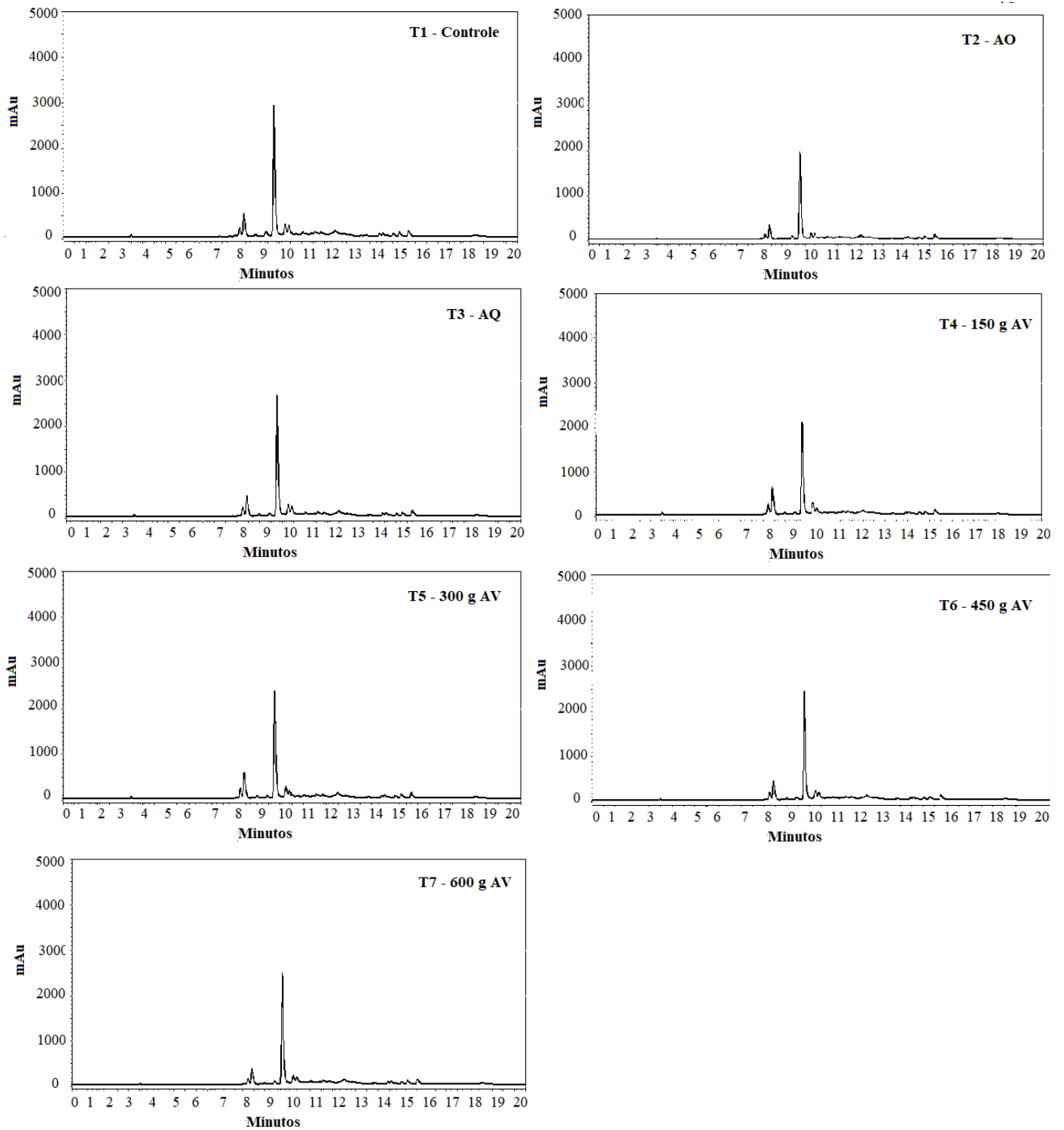


Figura 6. Perfis Cromatográficos obtidos por CLAE - DAD (quantificação de verbascosídeo em folhas secas).

Tabela 12. Resultados da regressão linear para curvas analíticas de verbascosídeo, em dois dias consecutivos de análise.

Parâmetros estatísticos	Verbascosídeo		
	Curva 1	Curva 2	Curva média
Faixa linear (μg)		4-14	
Coefficiente de correlação	0,9991	0,9996	0,9994
Inclinação ($\times 10^6$)	2,73	2,71	2,72
Erro padrão da inclinação ($\times 10^4$)	4,6737	3,1242	3,8989
Intercepto ($\times 10^5$)	940770	730223	835497
Erro padrão do intercepto ($\times 10^5$)	4,2425	2,8360	3,53927

Comportamento estatístico similar ao observado para os teores de flavonoides totais foi observado para o verbascosídeo. Assim como para os flavonoides totais, o teor de verbascosídeo também indicou maior acúmulo no tratamento controle. Porém, na seguinte ordem decrescente: adubação química, adubações verde nas doses de 600, 450, 300 e 150 g/vaso e adubação orgânica (Tabela 9).

4.5 Análises multivariadas

Na análise de componentes principais observou-se que as variáveis se agruparam conforme seu desempenho, em diferentes quadrantes (Figura 7). Os componentes 1 e 2 explicaram 47,25% e 29,59% dos dados, respectivamente. Para cada eixo, os maiores valores indicam a variável mais representativa, explicando dessa forma a maior parcela da variância do conjunto original de dados. Assim para o eixo x, as variáveis que obtiveram maiores contribuições foram MSF (94%), MSFL (92%) e MSC (92%). Já para o eixo y, a variável que mais contribuiu foi o V (85%).

Pode-se observar que os tratamentos se agruparam em quatro diferentes grupos, de acordo com a sua resposta às diferentes adubações. O tratamento que recebeu o esterco bovino encontra-se isolado no terceiro quadrante, demonstrando ter correlação positiva com os teores de nitrogênio e os pigmentos fotossintetizantes, além de obter correlação negativa com o teor de óleo na planta. O oposto foi observado para o agrupamento dos tratamentos com adubação verde de 600 e 450 g/vaso, no primeiro quadrante e segundo quadrante, respectivamente. No quarto quadrante, é possível distinguir diferentes comportamentos entre os tratamentos, pois o controle encontra-se isolado no canto inferior esquerdo do gráfico, enquanto que os tratamentos com adubação química e adubação verde nas doses de 150 e 300 g/vaso tenderam a se agrupar. Os tratamentos localizados no quarto quadrante, demonstraram obter correlação direta com os fenóis totais e os flavonoides totais. Contudo esses tratamentos também apresentaram correlação negativa com as massas secas da planta, teor de verbascosídeo e o rendimento do óleo essencial.

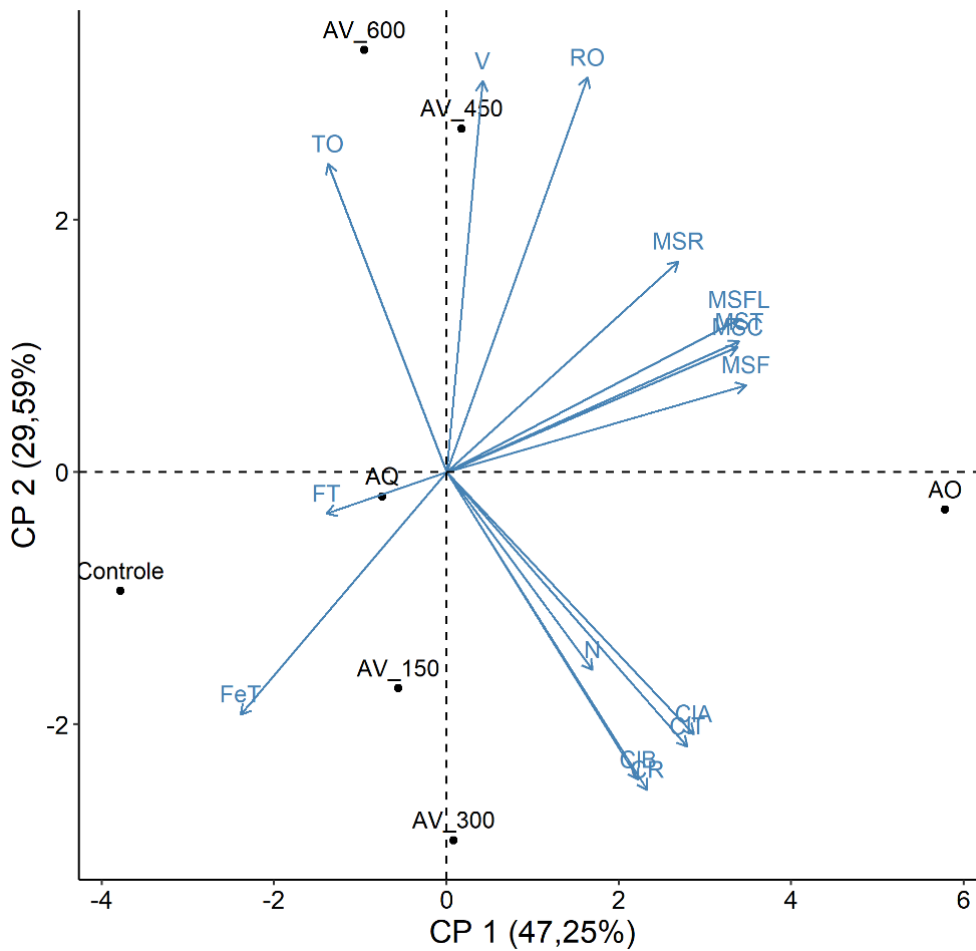


Figura 7. Projeção dos componentes principais (PCA) mostrando em detalhes as variáveis estudadas em relação aos tratamentos com adubação verde em doses de 0 g, 150 g, 300g, 450g, 600g, adubação orgânica, adubação química (AQ).

Em que: TO – Teor de óleo essencial; RO – Rendimento do óleo; V – Verbascosídeo; FT – Flavonoides totais; Fet – Fenois totais; N – Nitrogênio; MSR – Massa seca raiz; MSFL – Massa seca flor; MSF – Massa seca folha; MSC – Massa seca caule; CIA – Clorofila *a*; CIB – Clorofila *b*; CIT – Clorofila total; CR – Carotenoides

Nas redes de correlação bidimensional apresentada na Figura 8, podemos observar as interações entre as variáveis. Nessa figura, os pontos representam as variáveis analisadas, que são conectados por linhas. A cor da linha representa o tipo de interação, azul sendo interação positiva e vermelha negativa, e a espessura determina o peso dessa correlação, quanto mais forte a correlação entre duas variáveis, mais grossa é a linha que as conecta (EPSKAMP et al., 2012).

Pode-se observar que houve correlações positivas fortes entre as massas secas da planta e o rendimento do óleo essencial e entre esse último com o teor de óleo e de verbascosídeo. Já os fenóis totais apresentaram uma correlação negativa forte com a massa seca da planta. Os pigmentos fotossintéticos apresentaram forte correlação positiva entre si e com o teor de nitrogênio foliar, que por sua vez apresentou correlação negativa com o teor de verbascosídeo. Os flavonoides totais, apresentou correlação negativa com os pigmentos fotossintetizantes e também com o verbascosídeo. O teor de óleo também apresentou correlação negativa com os pigmentos fotossintetizantes.

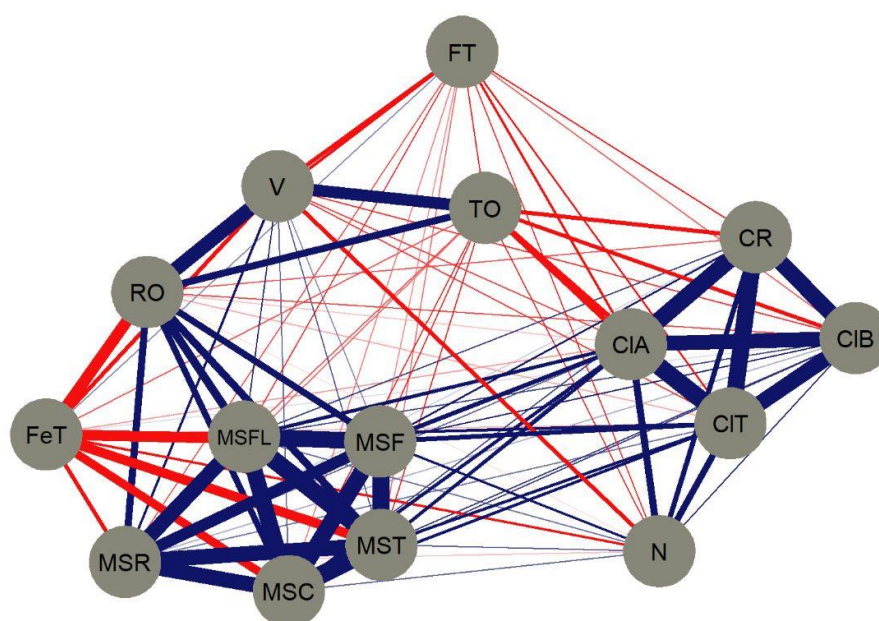


Figura 8. Rede de correlações entre as variáveis. A proximidade entre as características e a espessura da linha foi proporcional ao valor absoluto da correlação entre esses nós. Correlações positivas foram mostradas em azul e correlações negativas em vermelho.

Em que: TO – Teor de óleo essencial; RO – Rendimento do óleo; V – Verbascosídeo; FT – Flavonoides totais; Fet – Fenóis totais; N – Nitrogênio; MSR – Massa seca raiz; MSFL – Massa seca flor; MSF – Massa seca folha; MSC – Massa seca caule; CIA – Clorofila *a*; CIB – Clorofila *b*; CIT – Clorofila total; CR – Carotenoides.

5 DISCUSSÃO

Efeito no crescimento das plantas

A biomassa seca das plantas de *Lippia dulcis* teve um crescimento proporcional ao aumento das doses de adubo verde utilizadas. Esse resultado era esperado, já que a adubação verde teoricamente proporciona incrementos dos teores de nitrogênio no solo. O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para planta, participando de diferentes processos fisiológicos, como a fotossíntese (MALAVOLTA, 1980; DE JESUS et al. 2012). As observações do presente estudo são corroboradas pelas de Honorato et al (2022), Marques et al (2018) e Singh et al (2010) que observaram o aumento da massa seca de *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Mentha arvensis*, respectivamente, com o uso de adubação verde.

De acordo com a rede de correlação (Figura 7) foi observado relação positiva forte entre a produção de biomassa, rendimento do óleo essencial e o teor de verbascosídeo. A produção de metabólitos secundários de uma planta é influenciada por diferentes fatores, como sazonalidade, temperatura, material genético e, principalmente, pelo estágio de desenvolvimento da planta (FIGUEIREDO et al., 2008). Como resultado, qualquer fator que interfira na biomassa da planta, pode melhorar o rendimento seu óleo essencial (SINGH et al., 2007).

Apesar do tratamento com esterco bovino ter acumulado mais massa seca em comparação com os outros tratamentos, o mesmo obteve menor média de teor que consequentemente influenciou no menor rendimento do óleo essencial em comparação com os tratamentos de adubação verde. Os maiores teores e rendimento do óleo essencial proporcionado pelos tratamentos com adubo verde pode estar relacionada com o uso da *Crotalaria juncea*, já que essa leguminosa influencia nas características químicas do solo e disponibilidade de nutrientes, além de proteger o solo contra erosão (SILVA et al., 2021). O uso de *Crotalaria juncea* como planta fixadora de nitrogênio também proporcionou maior rendimentos de óleo essencial em *Lippia alba* em relação ao tratamento controle (MARQUES et al; 2018).

Em relação a adubação com esterco bovino, foi observado que a *Lippia dulcis*, obteve baixo teor de óleo de essencial. Esses resultados não corroboram com as pesquisas encontradas na literatura, pois o uso do esterco bovino em outras espécies contribuiu para o ganho de

biomassa, teor e rendimento do óleo essencial utilizando esse mesmo manejo (DE ASSIS et al., 2020; HONORATO et al., 2022).

Apesar da composição química do óleo essencial sofrer variações quantitativas de acordo com a fertilização ofertada para a planta, os constituintes majoritários presentes no óleo essencial de *Lippia dulcis* estão de acordo com os relatados em outros trabalhos da literatura (Adams et al., 2016; Germano et al., 2022). Assim como no presente estudo, Adams et al. (2016) também relataram os sesquiterpenos bisabolânicos, hernandulcina e α -bisabolol como constituintes majoritários em plantas de *Lippia dulcis* cultivadas no Brasil. A influência da variação sazonal na composição química do óleo essencial de *Lippia dulcis* foi avaliada por Germano et al. (2022). As plantas foram cultivadas em canteiros e adubadas com esterco bovino. Os constituintes principais identificados no óleo essencial de *L. dulcis* avaliado por esses autores indicaram a presença de hernandulcina, epi- α -bisabolol, α -copaeno e β -cariofileno, os quais não variaram expressivamente durante as estações.

O tratamento sem adubação (controle) indicou o maior teor de verbascosídeo. De acordo com GOBBO-NETO et al (2007), este fenômeno é comum, pois algumas espécies tendem a produzir mais metabólitos secundários quando submetidas a condições de estresse. No entanto, o tratamento controle foi o que acumulou a menor biomassa seca da parte aérea, não sendo interessante para a obtenção da matéria-prima vegetal, devido este princípio ativo estar presente nas folhas. Neste caso, a adubação verde com 600 g/vaso associa ganho de biomassa e teor de verbascosídeo.

A partir da análise da rede de correlação (Figura 7), pode-se observar que a correlação entre o verbascosídeo e a massa seca da planta possuem correlação positiva fraca. Como esse dado indica que o verbascosídeo é produzido em situações de estresse fisiológico, deve-se avaliar outros tipos de estresse fisiológicos em estudos futuros.

O teor de fenóis totais produzidos em *Lippia dulcis* decresceu à medida que aumentou a dose de adubo verde e também demonstrou uma correlação negativa com a produção de biomassa e rendimento do óleo essencial. Alguns estudos com plantas medicinais mostraram que o manejo pode influenciar na produção de metabólitos secundários de espécies medicinais (SHU, ZHOU, YANG et al., 2018). Ao trabalhar com diferentes doses de adubação orgânica em *Achyrocline satureioides*, Garcia et al. (2019) observaram que a partir da dose de 9 kg.m² de esterco bovino, foi reduzido o conteúdo de fenólicos totais nas inflorescências da planta.

Efeito no nitrogênio e pigmentos fotossintetizantes

O teor de clorofila e carotenoides produzidos pelas plantas está diretamente relacionado a eficiência fotossintética das mesmas e, conseqüentemente, a quantidade de nitrogênio absorvida pela planta (POUDEL; KATAOKA E MOCHIOKA, 2008). Estudos mostram que o nitrogênio cumpre um papel importante na regulação da síntese de pigmentos fotossintéticos nas folhas das plantas, e que o mesmo possui uma correlação positiva significativa com o teor de clorofila das culturas (PENG et al., 2021). Tais estudos corroboram com os resultados encontrados nesse trabalho, no qual os tratamentos com maiores teor de nitrogênio acumulado nas folhas de *Lippia dulcis* apresentaram também maiores médias de pigmentos fotossintetizantes.

De acordo com a rede de correlação (Figura 7), o nitrogênio apresentou uma correlação negativa com a produção de verbascosídeo. Esse resultado é coerente, já que foi observado que o menor suprimento de nitrogênio (tratamento controle) proporcionou o maior acúmulo de verbascosídeo. Efeito antagônico foi observado por Honorato, *et al.* (2022) que avaliaram os efeitos da adubação verde, orgânica e química em *Thymus vulgaris*. Esses autores observaram que o maior acúmulo de nitrogênio proporcionou um aumento na concentração de timol no óleo essencial dessa espécie. Porém na espécie *Lippia dulcis* quanto maior o teor de nitrogênio presente nas folhas, menor foi o teor de verbascosídeo.

Os fenóis e flavonoides totais demonstraram ter influência direta com os tratamentos controle, adubação química e adubação verde nas doses de 150 e 300 g, de acordo com a análise dos componentes principais. (Figura 6). De acordo com BONG; PHILLIPHS (1995), o suprimento de nitrogênio tem um efeito negativo na biossíntese de flavonoides nas plantas. Em *Labisia pumila*, Ibrahim et al. (2011) reportaram que à medida que aumentou a quantidade de nitrogênio na adubação, a quantidade de flavonoides totais diminuiu. Condição similar foi observada em *Lippia dulcis*, pois as plantas adubadas com crotalária acumularam menos flavonoides totais em suas folhas e indicaram correlação negativa tanto com os pigmentos fotossintéticos quanto com o teor de nitrogênio. Isso está de acordo com a teoria do balanço de nutrientes de carbono (CNB), no qual aponta que plantas quando passam por algum tipo de estresse, alocam a sua energia para produção de metabolitos secundários (BRYANT et al., 1983).

Efeito da adubação verde

A adubação verde é uma alternativa a agricultura convencional, no qual se faz uso de outras plantas como adubo para a cultura principal, sendo muito interessante para o cultivo de plantas medicinais. Estudos recentes têm apontado que essa prática agrícola aumenta produção de biomassa e teor e rendimento do óleo essencial (MARQUES et al; 2018; HONORATO et al., 2022). Linhares et al. (2012) observaram que as doses de *Merremia aegyptia* melhorou rendimentos agrônômicos do *Coriandrum sativum*, como número de hastes por planta, rendimento e peso da parte aérea e altura. As plantas leguminosas, como a *Crotalaria juncea*, são comumente usadas como adubos verdes, dentre outros fatores, por apresentarem ótima fixação do nitrogênio no solo (MEENA et al. 2020; SILVA e MENEZES, 2007).

O manejo nutricional em plantas medicinais é recomendado por contribuir ganhos em biomassa e nos metabólicos secundários, assim como encontrado, em alguns estudos, para gênero *Lippia* (SHAHOSEINI et al., 2018). Em *Lippia gracilis* a adubação com diferentes fontes e doses de esterco avícola influenciaram significativamente na produção de biomassa, crescimento, composição química do óleo, nos compostos fenólicos e no teor de clorofila dessa espécie (ALMEIDA et al., 2018). Em *Lippia citiodora* o uso de adubos de origem animal e vermicomposto proporcionaram diferenças significativas na composição do óleo essencial dessa espécie (KIAFAR; KHOMMAMI; ZADEH, 2013).

No geral o uso de adubação verde proporcionou melhorias significativas nas plantas de *Lippia dulcis*, tanto na parte agrônômica, quanto no metabolismo secundário dessa espécie. Apesar de estudos com adubação verde em plantas medicinais serem escassos, os resultados desse trabalho indicaram que essa planta responde positivamente ao esterco bovino e adubação verde, porém estudos adicionais precisam ser avaliados para estabelecer qual o melhor manejo de fertilização para essa espécie.

6 CONCLUSÃO

- O uso de adubação verde favoreceu o crescimento em biomassa da *Lippia dulcis*, em que o melhor desempenho foi na dose de 600 g.
- O uso de adubação verde aumentou o rendimento e o teor de óleo essencial da *Lippia dulcis* nas doses de 450 e 600 g.
- O uso de adubação verde não influenciou na produção de compostos fenólicos.
- O uso de adubação verde favoreceu a produção de verbascosídeos, em que o melhor desempenho foi na dose de 600 g.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Brígida Resende, Produção de biomassa e análises químicas de constituintes volatéis e fenólicos de *Lippia gracilis* Schauer sob omissão de nutrientes e adubação orgânica. 2016. 93 f. Dissertação (Mestrado em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016
- ADAMS, Robert P.; OLIVEIRA, P. F. Comparison of intensely sweet volatile leaf oils of *Lippia dulcis* (Verbenaceae) with low and high camphor from Brazil and Mexico. **Phytologia**, v. 98, p. 207-212, 2016.
- BIBIANO, Camila Silva et al. Organic manure sources play fundamental roles in growth and quali-quantitative production of essential oil from *Dysphania ambrosioides* L. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111512, 2019.
- BONGUE-BARTELSMAN, M.; Phillips, D.A. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. **Plant Physiol. Biochem** 1995, 33, 539–546.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normas climatológicas de 1961-1990**. Brasília, 992. 84 p. 1992.
- BRYANT, John P.; CHAPIN III, F. Stuart; KLEIN, David R. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. **Oikos**, p. 357-368, 1983.
- COMPADRE, C. M. et al. Hernandulcin: an intensely sweet compound discovered by review of ancient literature. **Science**, New York, v. 227, p. 417-419, 1985
- DE ASSIS, Rafael Marlon Alves et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic manure enhance growth and accumulation of citral, total phenols, and flavonoids in *Melissa officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p. 112981, 2020.
- DE JESUS, G. L. et al. Doses e fontes de nitrogênio na produtividade de eucalipto e nas frações da matéria orgânica em solo da região do cerrado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa**, v. 36, n.1, p. 201-214, 2012
- DOS SANTOS MARQUES, Carla Teresa et al. Improvement of biomass and essential oil production of *Lippia alba* (Mill) NE Brown with green manures in succession. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 113-118, 2018.
- ESPINDOLA, Jose AA et al. Adubação verde com leguminosas. Brasília, DF: **Embrapa Infomação Tecnológica; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005.**, 2005.
- EPSKAMP, S.; CRAMER, A. O. J.; WALDORP, L. J.; SCHMITTMANN, V. D.; BORSBOOM, D. qgraph: network visualizations of relationships in psychometric data. **Journal of Statistical Software**, v.48, p.1-18, 2012.
- FACCO, Giovani et al. Basic experimental unit and plot sizes for fresh matter of sunn hemp. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.
- FEITOSA, D. G. et al. Crescimento de mudas de gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) sob diferentes fontes e doses de nitrogênio. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 3, p. 401-411, 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia. Lavras** v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014

FIGUEIREDO, A. Cristina et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FILHO, J. F. A. et al. Multicomponent Mannich reactions: General aspects, methodologies and applications. **Tetrahedron**, v. 73, n. 50, p. 6977–7004, 2017.

GARCIA, D. F. et al. Promising phytochemical responses of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. under various farming conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 129, n. March, p. 440-447, 2019

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

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

HONORATO et al. Combining green manure and cattle manure to improve biomass, essential oil, and thymol production in *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, v. 187, p. 115469, 2022.

HUSSAIN, M. et al. Efficacy of fertilizing method for different potash sources in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) nutrition under arid climatic conditions. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 1, 2020.

IBRAHIM, Mohd Hafiz et al. Involvement of nitrogen on flavonoids, glutathione, anthocyanin, ascorbic acid and antioxidant activities of Malaysian medicinal plant *Labisia pumila* Blume (Kacip Fatimah). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 393-408, 2011.

KIAFAR, Roghayyeh; ZADEH, Mehrdad Akbar; KHOMMAMI, A. Mahboub. Investigation of the effect of some organic fertilizers on the oil of lemon verbena (*Lippia citriodora* L.) and its antibacterial effects. **International Journal of Farming and Allied Sciences**, v. 2, n. 20, p. 866-71, 2013.

KOPSELL, D.E.; Kopsell, D.A.; Randle, W.M.; Coolong, T.M.; Sams, C.E.; Celentano, J.C. Kale carotenoids remain stable while flavor compounds respond to changes in sulfur fertility. **J. Agric. Food Chem.** 2003, 51, 5319–5325

LEI, Beining; WANG, Juan; YAO, Huaiying. Ecological and environmental benefits of planting green manure in paddy fields. **Agriculture**, v. 12, n. 2, p. 223, 2022.

LINHARES, P. C. F. et al. Yield of coriander (*Coriandrum sativum* L.) in a system of green manure with the plant scarlet starglory (*Merremia aegyptia* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 143-148, 2012.

MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo, Ceres, 1980. 251p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Potassa e do Fósforo, 1997. 319 p.

MEENA, Amrit Lal et al. Green Manure: A complete nutrient source for sustainable soil health in modern agriculture.

- MESQUITA GERMANO, Carolina et al. Seasonal variations during two years in the essential oil of *Lippia dulcis* Trevir., an exotic aromatic of the Amazon. **Journal of Essential Oil Research**, v. 34, n. 4, p. 352-360, 2022
- PENG, Jinfeng et al. Effects of nitrogen application rate on the photosynthetic pigment, leaf fluorescence characteristics, and yield of indica hybrid rice and their interrelations. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021.
- POUDEL P. R., KATAOKA I., MOCHIOKA R. Effect of red- and blue-light- emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 92, n. 2, p. 147–153, 2008.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 2-10, 2004.
- ROY, Arpita et al. Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022.
- SHAHHOSEINI, Reza et al. Effect of fertilizers and superabsorbent hydrogel on the yield, essential oil content and composition of Lemon verbena (*Lippia citriodora* Kunth.) cultivated in Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 1, p. 230-236, 2018
- SHU, K.; ZHOU, W.; YANG W. APETALA 2-domain-containing transcription factors: focusing on abscisic acid and gibberellins antagonism. **New Phytol**, v. 217, n. 1, p. 977-983, 2018
- SILVA, M.A., Nascente, A.S., Frasca, L.L.d.M., Rezende, C.C., Ferreira, E.A.S., Filippi, M.C.C.d., Lanna, A.C., Ferreira, E.P.d.B., Lacerda, M.C., Isolated and mixed cover crops to improve soil quality and commercial crops in the Cerrado. **Res. Soc.** 2021.
- SILVA, Sérgio Macedo et al. Organo-mineral fertilization effects on biomass and essential oil of lavender (*Lavandula dentata* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 103, p. 133-140, 2017.
- SILVA, Tácio Oliveira da; MENEZES, Rômulo Simões Cezar. Organic fertilization of potato with manure and, or, *Crotalaria juncea*: II-soil N, P, and K availability throughout the growing season. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 51-61, 2007.
- SINGH, Man et al. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) as a green manure to improve the productivity of a menthol mint (*Mentha arvensis* L.) intercropping system. **Industrial crops and products**, v. 31, n. 2, p. 289-293, 2010.
- STEWART, J.W.; Chapman, G.I.; Jenkins, I.; Graham, T.; Crozier, A. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. **Plant Cell Environ** 2001, 24, 1189–1197.
- TEODORO, Mauro Sergio et al. Biomass yield of *Crotalaria juncea* after thinning and at varied sowing densities in the Coastal Plateau of Piauí State, Brazil. **Revista Caatinga**, v. 29, p. 878-884, 2016.
- TIAN, C. *et al.* Balanced fertilization under different plant densities for winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on paddy soils in Southern China. **Industrial Crops and Products**, London, v. 151, Sept. 2020.
- VANISREE, Mulabagal et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Bot. Bull. Acad. Sin**, v. 45, n. 1, p. 1-22, 2004.

VERTUANI, Silvia et al. Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7068-7080, 2011.

XAVIER, Francisco Alisson da Silva; OLIVEIRA, Jose Ivo Aragão; SILVA, Marcos Roberto da. Decomposition and nutrient release dynamics of shoot phytomass of cover crops in the Recôncavo Baiano. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.