



**ALAN DA CUNHA HONORATO**

**LIGHT QUALITY AND ORGANIC FERTILIZATION  
PROMOTE GROWTH AND ALTERS OXIDATIVE STRESS  
AND ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF *Thymus vulgaris* L.**

**LAVRAS-MG**

**2021**

**ALAN DA CUNHA HONORATO**

**LIGHT QUALITY AND ORGANIC FERTILIZATION PROMOTE GROWTH AND  
ALTERS OXIDATIVE STRESS AND ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF *Thymus  
vulgaris* L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em produção vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. (a) Dr.(a) Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Orientador (a)

Prof. (a) Dr.(a) José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Coorientador (a)

**LAVRAS-MG**

**2021**

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

Honorato, Alan da Cunha.

Light quality and organic fertilization promote growth and alters oxidative stress and essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. /

Alan da Cunha Honorato. – 2021

135 p.: il.

Orientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Coorientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto

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

Bibliografia.

1. Manejo de cultivo; 2. Maximização da produção; 3. Nutrição e metabolismo vegetal; 4. Manejo do adubo; 5. Plantas medicinais e condimentares; I. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. II. Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. III. Título.

**ALAN DA CUNHA HONORATO**

**LIGHT QUALITY AND ORGANIC FERTILIZATION PROMOTE GROWTH AND ALTERS OXIDATIVE STRESS AND ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF *Thymus vulgaris* L.**

**QUALIDADE DE LUZ E A FERTILIZAÇÃO ORGÂNICA PROMOVEM O CRESCIMENTO E ALTERA O ESTRESSE OXIDATIVO E A COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 13 de abril de 2021.

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto	UFLA
Prof. Dra. Andressa Giovannini Costa	UFU
Prof. Dr. Felipe Campos Figueiredo	IFSULDEMINAS
Prof. Dr. Osmar Alves Lameira	EMBRAPA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Orientadora

LAVRAS-MG

2021

A Deus,  
que me iluminou, guardou e contemplou com inúmeras graças, dentre elas o discernimento e perseverança para superar e gozar das adversidades do caminho da vida.

Aos meus pais (João Jurema e Cileuza Almeida), a minha esposa e filho (Jessica Coelho e Gabriel Honorato), a minhas irmãs (Amanda Honorato e Camila Honorato), a meus compadres (Tomás Azevedo e Aline Passos), a meus avós (Marcos, Estela, Didi, Antônio, Francisca e Josefa) pelo incentivo e por serem a base que me sustenta e proporcionaram mais essa conquista.

Aos meus amigos que me incentivaram e muito me ajudaram. Em especial posso citar: Ana Paula; Juliano; Giulia Duarte; Leandro Simão (Dico); Paulo Vitor; Daniel Amorim; Marília Mickaele; Thainá de Oliveira; Gabriel Akira; João Francisco; Rafael Marlon; Annete Boari; Alexandre Carvalho; José Eduardo Brasil; Suzan Kelly.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus, razão de minha existência e proprietário de minhas obras. “Só tu oh pai, sabe o propósito de tudo, em tuas mãos navego pelas veredas da vida.”

Também agradeço a toda minha família, em especial a minha esposa, meu filho, meu pai, minha mãe e minhas irmãs. Vocês foram e são a principal razão de minha vida, onde encontro força e apoio, esta vitória também é de vocês. Amo todos vocês!!!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), principalmente aos Programas de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia e de Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, pela formação acadêmica, por todo acolhimento, instrução, serviços prestados e estrutura cedida para estudos, pesquisas e demais atividades.

Meu grande agradecimento a minha orientadora Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci e coorientador Ph.D José Eduardo Brasil Pereira Pinto pelo apoio, dedicação, orientação e conhecimentos transmitidos que muito contribuíram para minha formação profissional e também como pessoa.

Agradeço a toda equipe do Horto de Plantas Medicinais e do Laboratório de Fitoquímica e Cultura de Tecidos Vegetais da UFLA, pelo apoio, dedicação e amizade, em especial aos colegas Giulia Duarte, Leandro Simão (Dico), Paulo Vitor (Paulinho), Annete Boari e Evaldo.

Ao Pós-doutorando do Programa de Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, Alexandre Alves de Carvalho e à coordenadora do Programas de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia Dr.(a) Patrícia Duarte de Oliveira Paiva pela dedicação e relevantes contribuições neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro e disponibilidade de recursos necessários à realização do projeto.

Aos professores da UFLA pelos quais tive a satisfação de ter algum contato, pelos ensinamentos transmitidos com seriedade e compromisso.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

“Deus transforma choro em sorriso, dor em força, fraqueza em fé e sonho em realidade.”  
(Autor desconhecido)

## RESUMO GERAL

O cultivo de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) demanda informações de manejo que impliquem em ganhos estratégicos na produção vegetal e nas propriedades fitoquímicas. Neste sentido, objetivou-se estudar a influência do cultivo em diferentes condições de luz e de adubação orgânica sobre o estresse oxidativo e as características fitotécnicas, fisiológicas, nutricionais e quanti-qualitativas do óleo essencial de tomilho, em Lavras-MG, Brasil. Para isto foram conduzidos três experimentos nos quais avaliaram-se: peso seco das folhas, caule, raiz e total; pigmentos fotossintéticos; macronutrientes e micronutrientes; atividades antioxidantes não-enzimática; assim como, parâmetros relacionados à produção e qualidade do óleo essencial (OE). No experimento de condições de luz, cultivou-se o tomilho nas estações do outono e primavera em condição de pleno sol e sob malhas azul, preta e vermelha. Dessa forma, observou-se que a estação da primavera trouxe ganhos significativos para as plantas independente das condições luminosas. Em contrapartida, o pleno sol proporcionou maior atividade antioxidante, maior peso seco e rendimento de OE em relação aos cultivos sob malhas. Para avaliar os efeitos da adubação orgânica, dois experimentos foram conduzidos. No primeiro, cultivou-se o tomilho sem adubação e com adubação orgânica (Dose de 8 kg m<sup>-2</sup> de mistura proporcional de esterco de codorna, bovino e caprino) e fertilizante químico. Nesse experimento, a aplicação da adubação orgânica resultou em ganhos expressivos do peso seco das plantas, acúmulo de macronutrientes e micronutrientes e do teor e rendimento de timol nas folhas. No segundo experimento de adubação, as plantas foram submetidas aos tratamentos: controle (sem adubação), adubação química e adubação com três fontes de esterco (codorna, bovino e caprino) em quatro doses (2, 4, 8 e 12 Kg m<sup>-2</sup>). Os estercos de codorna e bovino resultaram em maiores ganhos de peso seco e de grande parte dos nutrientes foliares, em relação ao esterco de caprino e adubação química. De modo geral, as plantas apresentaram respostas lineares e quadráticas as doses de esterco. As plantas cultivadas com 12 Kg m<sup>-2</sup> de esterco bovino obtiveram o maior rendimento de OE, chegando a ser 710% superior ao tratamento controle. Conclui-se que as melhores alternativas para o cultivo de *T. vulgaris* na região de Lavras-MG são a estação da primavera e a condição de pleno sol; A adubação orgânica maximiza a produção vegetal e o rendimento de compostos de interesse de tomilho; Os estercos bovino e de codorna nas doses entre 8 e 12 Kg m<sup>-2</sup> indicaram ser uma opção de referência na adubação do tomilho.

**Palavras-chave:** Produção vegetal. Condições de luz. Estercos. Caprino. Bovino. Codorna.



## ABSTRACT

The cultivation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) requires management information that implies strategic gains in plant production and phytochemical properties. In this sense, the objective was to study the influence of cultivation under different conditions of light and organic fertilization on oxidative stress and phytotechnical, physiological, nutritional and quantitative-qualitative characteristics of thyme essential oil, in Lavras-MG, Brazil. For this, three experiments were conducted in which they were evaluated: dry weight of leaves, stem, root and total; photosynthetic pigments; macronutrient and micronutrient; non-enzymatic antioxidant activities; as well as parameters related to the production and quality of essential oil (OE). In the experiment of light conditions, thyme was grown in the fall and spring seasons in full sun and under blue, black and red nets. Thus, it was observed that the spring season brought significant gains for the plants regardless of the light conditions. In contrast, the full sun provided greater antioxidant activity, greater dry weight and OE yield in relation to the crops under nets. To assess the effects of organic fertilization, two experiments were conducted. In the first, thyme was grown without fertilization and with organic fertilization (Dose of 8 kg m<sup>-2</sup> of proportional mixture of quail, cattle and goat manure) and chemical fertilizer. In this experiment, the application of organic fertilization resulted in expressive gains in the dry weight of the plants, accumulation of macronutrients and micronutrients and in the content and yield of thymol in the leaves. In the second fertilization experiment, the plants were subjected to treatments: control (without fertilization), chemical fertilization and fertilization with three sources of manure (quail, cattle and goat) in four doses (2, 4, 8 and 12 Kg m<sup>-2</sup>). Quail and cattle manure resulted in greater gains in dry weight and a large part of leaf nutrients, in relation to goat manure and chemical fertilization. In general, the plants showed linear and quadratic responses to manure doses. Plants grown with 12 Kg m<sup>-2</sup> of cattle manure obtained the highest OE yield, reaching 710% higher than the control treatment. It is concluded that the best alternatives for the cultivation of *T. vulgaris* in the region of Lavras-MG, are the spring season and the condition of full sun Organic fertilization maximizes plant production and the yield of compounds of interest to thyme; The cattle and quail manure at doses between 8 and 12 Kg m<sup>-2</sup> indicated to be a reference option in the fertilization of thyme.

**Keywords:** Vegetable production. Light conditions. Manure. Goat. Cattle. Quail.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	13
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE (<i>Thymus vulgaris</i> L.)</b> .....	15
<b>2.1.1</b>	<i>Origem e distribuição</i> .....	15
<b>2.1.2</b>	<i>Descrição da planta e aspectos agronômicos</i> .....	16
<b>2.1.3</b>	<i>Propriedades medicinais e funcionais do tomilho</i> .....	19
<b>2.2</b>	<b>QUALIDADE E INTENSIDADE DE LUZ</b> .....	22
<b>2.2.1</b>	<i>Papel da luz nas plantas</i> .....	22
<b>2.2.2</b>	<i>Resposta das plantas a qualidade e intensidade de luz</i> .....	23
<b>2.2.3</b>	<i>Uso de malhas de sombreamento</i> .....	24
<b>2.3</b>	<b>ADUBAÇÃO ORGÂNICA</b> .....	27
<b>2.3.1</b>	<i>Uso de estercos como fertilizante orgânico</i> .....	27
<b>2.3.2</b>	<i>Melhoria das características do solo com a utilização da adubação orgânica</i> .....	29
<b>2.3.3</b>	<i>Respostas das plantas medicinais à adubação orgânica</i> .....	30
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	41
	<b>ARTIGO 1 – COLORED SHADE NETS AND DIFFERENT HARVEST TIMES ALTER THE GROWTH, ANTIOXIDANT STATUS, AND QUANTITATIVE ATTRIBUTES OF GLANDULAR TRICHOMES AND ESSENTIAL OIL OF <i>Thymus vulgaris</i> L.</b> .....	41
	<b>ABSTRACT</b> .....	41
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	42
<b>2</b>	<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	43
<b>2.1</b>	<b>ANALYSIS OF PLANT GROWTH</b> .....	43
<b>2.2</b>	<b>OXIDATIVE STRESS</b> .....	44
<b>2.3</b>	<b>MEASUREMENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS</b> .....	45
<b>2.4</b>	<b>DISTILLATION AND CHEMICAL ANALYSIS OF ESSENTIAL OIL</b> .....	46
<b>2.5</b>	<b>ANALYSIS OF TRICHOMES</b> .....	46
<b>2.6</b>	<b>STATISTICAL ANALYSIS</b> .....	47
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	47
<b>3.1</b>	<b>ANALYSIS OF PLANT GROWTH</b> .....	47
<b>3.2</b>	<b>OXIDATIVE STRESS</b> .....	49
<b>3.3</b>	<b>PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS</b> .....	50
<b>3.4</b>	<b>ESSENTIAL OIL AND ANATOMICAL ANALYSIS</b> .....	51

4	CONCLUSIONS.....	54
	ACKNOWLEDGEMENTS.....	54
	REFERENCES.....	54
	<b>ARTIGO 2 – A ADUBAÇÃO ORGÂNICO REDUZ O ESTRESSE OXIDATIVO E MAXIMIZA O RENDIMENTO DE TIMOL E A PRODUÇÃO VEGETATIVA DE <i>Thymus vulgaris</i> L.....</b>	<b>65</b>
	RESUMO .....	65
1	INTRODUÇÃO.....	66
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	67
2.1	DELINEAMENTO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO .....	67
2.2	PESO SECO DA BIOMASSA VEGETAL .....	69
2.3	ANÁLISE FOLIARES DE MACRONUTRIENTES E MICRONUTRIENTES.....	69
2.4	ENSAIOS INDICATIVOS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	69
2.4.1	<i>Preparo das amostras</i> .....	69
2.4.2	<i>Fenóis Totais</i> .....	69
2.4.3	<i>Captura de radicais livres DPPH</i> .....	70
2.4.4	<i>Atividade antioxidante total / ensaio de fosfomolibdênio (TAC)</i> .....	70
2.4.5	<i>Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC) / sequestro do Radical Peroxil</i> .....	71
2.5	ANÁLISE DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS .....	71
2.6	ANÁLISES QUANTITATIVAS DO ÓLEO ESSENCIAL E PRODUTIVIDADE AGRÍCOLA DE TIMOL.....	72
2.6.1	<i>Teor de óleo essencial</i> .....	72
2.6.2	<i>Doseamento de timol</i> .....	72
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
3.1	ANÁLISE DE CRESCIMENTO DAS PLANTAS.....	74
3.2	ENSAIOS INDICATIVOS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	75
3.3	PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS .....	77
3.4	ANÁLISES QUANTITATIVAS DO ÓLEO ESSENCIAL E DE TIMOL .....	78
3.5	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	79
4	CONCLUSÕES.....	81
	AGRADECIMENTOS .....	81
	REFERÊNCIAS.....	81
	<b>ARTIGO 3 – FERTILIZATION WITH DIFFERENT MANURE SOURCES AND DOSES PROVIDES QUANTITATIVE-QUALITATIVE GAINS IN THE PRODUCTION OF <i>Thymus vulgaris</i> L. ....</b>	<b>92</b>

	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>92</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>93</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>94</b>
<b>2.1</b>	<b>EXPERIMENTAL SETUP AND PROCEDURE .....</b>	<b>94</b>
<b>2.2</b>	<b>LEAF ANALYSIS .....</b>	<b>96</b>
<b>2.3</b>	<b>PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS .....</b>	<b>96</b>
<b>2.4</b>	<b>OXIDATIVE STRESS .....</b>	<b>97</b>
<b>2.5</b>	<b>DISTILLATION AND CHEMICAL ANALYSIS OF ESSENTIAL OIL .....</b>	<b>97</b>
<b>2.6</b>	<b>STATISTICAL ANALYSIS .....</b>	<b>98</b>
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>98</b>
<b>3.1</b>	<b>EFFECTS ON VEGETATIVE GROWTH.....</b>	<b>98</b>
<b>3.2</b>	<b>EFFECTS ON PLANT NUTRITION .....</b>	<b>100</b>
<b>3.3</b>	<b>EFFECTS ON PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS.....</b>	<b>101</b>
<b>3.4</b>	<b>EFFECT ON OXIDATIVE STRESS .....</b>	<b>102</b>
<b>3.5</b>	<b>EFFECTS ON THE PRODUCTION AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL.....</b>	<b>104</b>
<b>3.6</b>	<b>PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS .....</b>	<b>106</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>108</b>
	<b>ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>109</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>109</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>122</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 Introdução geral

As dietas ricas em substâncias naturais com propriedades antioxidantes, anticancerígena, anti-neurodegenerativa e anti-inflamatória são desejáveis para a saúde humana (GUPTA; PRAKASH, 2014). Nesse contexto, plantas medicinais, condimentares e olerícolas têm contribuído positivamente no suprimento de alimentos saudáveis. De acordo com Nanasombat et al. (2015), essas plantas possuem propriedades nutritivas para o consumo humano, além de ser fonte de componentes funcionais vitais para o metabolismo humano, desempenham um papel positivo, mantendo e modulando a função imunológica para prevenir doenças específicas.

A família Lamiaceae possui grande diversidade de ervas produtoras de óleo essencial com importância farmacêutica e nutracêutica (SHARAFZADEH; ZARE, 2011; POURHOSSEINI et al., 2020). O tomilho, orégano e manjeriço pertencem a essa família e são amplamente utilizadas na culinária brasileira e no mundo. O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma erva de aroma característico e produtora de óleo essencial que tem ganhado espaço na medicina e culinária global, possuindo compostos químicos importantes como flavonoides e antioxidantes fenólicos como zeaxantina, luteína, apigenina, naringenina, luteolina e timonina (GRIGORE et al., 2010; ALIREZA et al., 2015; DAUQAN; ABDULLAH, 2017). Além disso, as folhas dessa espécie são ricas em potássio, ferro, cálcio, manganês, magnésio e selênio (MOHAMED et al., 2013; SHARANGI; GUHA, 2013).

Por outro lado, é importante destacar que as propriedades biológicas e aromáticas do tomilho são determinadas, dentre outros fatores, pela composição química do seu óleo essencial e dos seus diferentes extratos (TOHIDI et al., 2019; KOSAKOWSKA et al., 2020). Nesse sentido, o valor econômico, quando a finalidade é a produção de óleo essencial, é determinado pelas características químicas do óleo essencial nas plantas (AKHZARI; PESSARAKLI, 2015). Esses compostos são influenciados por fatores ambientais, como a disponibilidade de água, luz, temperatura, umidade, nutrição, tipo de solo, etc. (MAIK et al., 2014). Assim, investigar o efeito de diferentes condições de manejo agrícola de espécies medicinais, condimentares e hortícolas é importante para definir estratégias de produção que maximizem o crescimento vegetativo, teor e composição química das plantas.

A adubação é um dos principais fatores que influenciam a produção das culturas em climas tropicais. O uso da adubação orgânica promove benefícios na produção de biomassa,

rendimento e qualidade de óleos essenciais (BIBIANO et al., 2019). Neste sentido, a nutrição mineral das plantas advinda da adubação orgânica tem se destacado no cultivo de espécies medicinais e condimentares. Os fertilizantes orgânicos são insumos de baixo custo, que promovem melhoria das qualidades físicas, químicas e biológicas do solo (CORRÊA et al., 2010; SHAJI et al., 2020). De acordo com Souza et al. (2012), esse benefício depende da dose e da fonte do material utilizado. Por outro lado, a origem do material orgânico deve ser de boa procedência com objetivo de garantir a sanidade das plantas e, principalmente, a segurança alimentar, uma vez que as plantas podem ser consumidas *in natura* ou processadas.

Dentre as fontes de fertilizantes orgânicos, o esterco é o mais encontrado e utilizado em diferentes regiões do Brasil e do mundo, uma vez que é produzido por diferentes espécies de animais, como bovinos, equinos, suínos e aves (TRANI et al., 2008). A região de Lavras-Minas Gerais, além de ser uma bacia leiteira, destaca-se também pela concentração de diversas granjas, que geram grandes quantidades de esterco de codorna. Estudos tem demonstrado a resposta positiva da cultura de *Thymus vulgaris* à adubação orgânica com esterco de gado, ovelha e galinha (ATEIA et al., 2009; HENDAWY et al., 2010). Entretanto, não foi encontrado na literatura as respostas de crescimento e produção de óleo essencial dessa planta cultivadas com esterco de codorna e caprino, tão pouco, estudos comparativos entre diferentes fontes e doses de esterco, avaliando aspectos nutricionais, fisiológicos e fitoquímicos.

Outra importante tecnologia agrônômica é o cultivo de plantas olerícolas, medicinais e frutíferas sob ambiente protegido, sob malhas de sombreamento. Essas malhas de sombreamento alteram o espectro de luz incidente e o microclima do ambiente de cultivo, objetivando proporcionar condições ideais de cultivo das plantas (MILENKOVIĆ et al., 2019). A luz é o principal fator no controle do crescimento e do desenvolvimento das plantas, por regular fatores fundamentais no vegetal como atividade fotossintética, temperatura foliar, pigmentos, abertura de estômatos, tipos e densidade de tricomas, dentre outros, tornando-se um fator chave na produção de diversos metabólitos, por influenciar a via metabólica de fixação de carbono (CHANG; ALDERSON; WRIGHT, 2008). Várias pesquisas têm relatado o efeito significativo de malhas coloridas em filtrar a luz solar incidente. A cor da malha utilizada altera os níveis de fotossíntese nas plantas, conseqüentemente, a produção de biomassa, anatomia da planta e a qualificação das substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas (ILIC; FALLIK, 2017). Para a espécie *T. vulgaris* não foram encontrados estudos comparativos da influência de diferentes malhas coloridas em seu cultivo.

## 2 Referencial teórico

### 2.1 Aspectos gerais da espécie (*Thymus vulgaris* L.)

#### 2.1.1 Origem e distribuição

Tomilho é o nome popular utilizado para muitas espécies de ervas nativas da Europa e da Ásia, a maioria pertencente ao gênero *Thymus* e comumente utilizadas como ervas, condimentos e especiarias, de modo a apresentar vários propósitos medicinais (STHAL-BISKUP; SAEZ, 2002). O gênero *Thymus*, um dos táxons mais importantes da família Lamiaceae, está amplamente distribuído por toda a extensão territorial mundial, com o centro de origem da maioria de suas espécies localizado na região do Mediterrâneo. O gênero é representado por cerca de 215 espécies, cuja principal característica é a produção de óleos essenciais e aromas característicos (TOHIDI et al., 2019). As espécies mais cultivadas e estudadas desse gênero são *T. serpyllum*, *T. algeriensis* e *T. vulgaris* (NIKOLIC et al., 2014).

A palavra grega *thyo* significa perfume e *thymus*, coragem, pois nos tempos medievais a planta era utilizada como fonte de revigoramento, sendo seu uso relatado pelos sumérios em 3500 a.C. e os antigos egípcios (DAFF, 2012; DAUQAN; ABDULLAH, 2017). O tomilho é produzido e comercializado a partir de plantas cultivadas e selvagens na maioria dos países europeus. O cultivo comercial da erva ocorre principalmente na Espanha, França, Itália e Bulgária, e cerca de 90% do seu óleo essencial comercializado no mundo é produzido na Espanha (KUETE, 2017). Os produtores do Sul da Europa são responsáveis por beneficiarem a maior quantidade de subprodutos derivados de *T. vulgaris* devido às vantagens climáticas dessa região que propicia seu cultivo (DAFF, 2012).

Até cerca de 1950, o tomilho comum era explorado apenas por meio do extrativismo vegetal. No entanto, atualmente, devido à ocorrência limitada dessa planta na natureza e o aumento expressivo do consumo, o tomilho foi introduzido como uma cultura (KOSAKOWSKA et al., 2020). Muitos ecotipos, variedades, e cultivares de tomilho estão disponíveis no mercado, já sendo possível observar muitos agricultores fazendo o uso de plantas melhoradas geneticamente, principalmente na Espanha, França, Itália e Bulgária (WESOLOWSKA; JADCZAK, 2019; KOSAKOWSKA et al., 2020). O tomilho é cultivado para fins comerciais em muitos países, tendo como finalidade a produção de folhas secas, óleo essencial, extratos e oleorresinas (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2012). No entanto, dada a grande importância econômica da espécie, ainda há necessidade de melhorar seu cultivo,

levando como alicerce o melhoramento genético e determinando estratégias de cultivo que aperfeiçoem sua produção (KOSAKOWSKA et al., 2020).

### **2.1.2 Descrição da planta e aspectos agronômicos**

As plantas de *Thymus vulgaris* L. são pequenos arbustos perenes, com cerca de 30 cm de altura e 40 cm de largura que geralmente são cultivados em canteiro ou em vaso (SALEH et al, 2015). O caule é tortuoso e lenhoso; os ramos são acinzentados, eretos e compactos; as folhas são sésseis, elípticas e/ou oblongo-obovadas/lanceoladas, esbranquiçadas na face inferior, muito pequenas, geralmente de 2,5 a 8 mm de comprimento e 1 a 4 mm de largura, variam significativamente na forma (oval a retangular) e na disposição na copa, dependendo da variedade; as flores são rosadas ou brancas, de dois lábios, com cerca de 05 mm de comprimento, com um cálice glandular e acompanhada de brácteas semelhantes a folhas em espirais soltas, localizadas em ramos nas axilares ou terminais (PRASANTH et al., 2014; KUETE, 2017; KOSAKOWSKA et al., 2020). Uma característica peculiar do tomilho é que suas hastes se tornam leves com a idade (PRASANTH et al., 2014). Alguns detalhes dessa espécie podem ser observados na figura 1 logo abaixo.

As plantas de tomilho mostram-se pouco exigentes em relação às condições edafoclimáticas, podendo ser encontrada e cultivada em diferentes tipos de solo e condições climáticas (DAFF, 2012). Geralmente, as plantas crescem bem em regiões de clima temperado, árido e semiárido, e em pleno sol (DAFF, 2012), entretanto, na Europa já se encontra cultivares resistentes a geada (REY; SÁEZ, 2002; KOSAKOWSKA et al., 2020). A recomendação de precipitação para seu cultivo é de 500 a 1000 mm por ano. Contudo, essa espécie não tolera umidade excessiva, devido ser susceptível a doenças de podridão (DAFF, 2012). Tem preferência por solos arenosos, com pH entre 5,0 a 8,0 e não é exigente em fertilidade (PRASANTH et al., 2014; KUETE, 2017).



Figura 1 - Aspectos e detalhamento de plantas de *Thymus vulgaris* L. cultivado em canteiro (A) e vaso (D), e detalhes do caule e folhas (B) e florescimento (C).

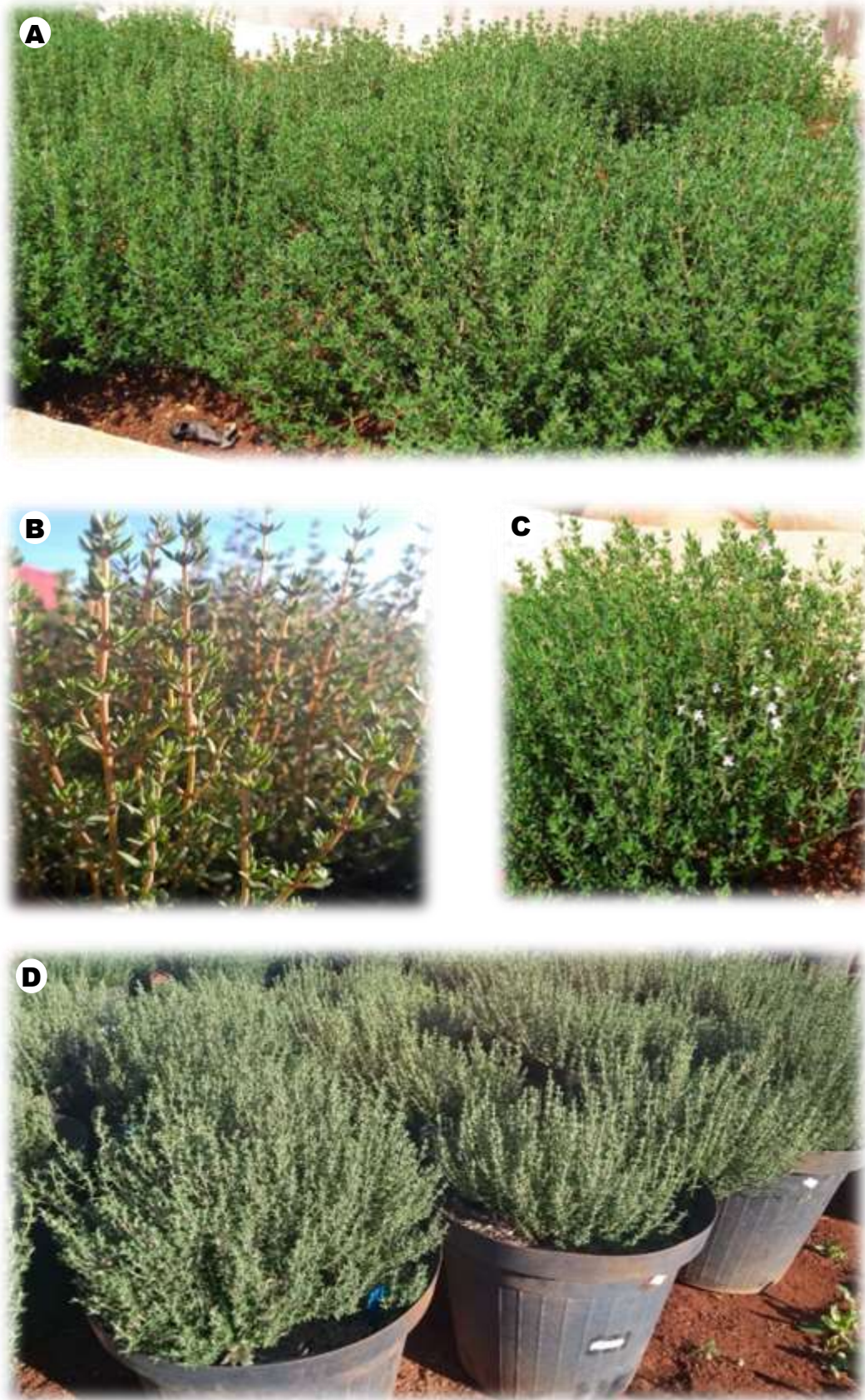


Foto: Do autor (2018).

A propagação do tomilho pode ser feita a partir de sementes, estacas de caule e rebentos (KUETE, 2017). Outra forma de propagação utilizada, tem sido a divisão das plantas junto com parte de suas raízes. O período mais apropriado para se semear o tomilho é na primavera com 6 mm ou menos de profundidade (DAFF, 2012; KUETE, 2017). As sementes geralmente germinam em cerca de duas semanas. Quando semeado em bandejas de germinação, são necessárias de seis a oito semanas para atingir o período de transplântio. Para obtenção de plantas homogêneas é aconselhável a produção de mudas pelo método de estaquia, pois há alta taxa de hibridação via sementes. O tomilho cresce facilmente com estacas de 5 a 10 cm de comprimento, preferencialmente quando retiradas na primavera. O transplântio das mudas deve ser feito antes do inverno, para que ocorra o pleno estabelecimento e crescimento (DAFF, 2012).

O espaçamento recomendado para cultivo de tomilho é de 15 a 30 cm entre plantas na fileira e largura de 60 cm entre fileiras. Aplicação de elevadas doses de fertilizante podem causar crescimento excessivo, fazendo com que os ramos tornam-se fracos e quebrem com facilidade. A aplicação de nitrogênio após a colheita é importante para promover o crescimento de novos brotos durante a estação de crescimento. Por outro lado, o excesso pode comprometer a qualidade do óleo essencial (BARANAUSKIENĖ et al., 2003). As recomendações de adubação para essa espécie são incipientes, tanto no que se refere a adubação química, como também a orgânica. Entretanto, os poucos trabalhos existentes com fertilizantes nessa espécie, já apontam que o tomilho cultivado de forma orgânica tende a possuir melhor qualidade de erva seca (aroma) e de óleo essencial, agregando assim valor ao produto (DAFF, 2012; SHARAF EL-DIN et al., 2019).

As pragas no tomilho não são muito frequentes, devido às propriedades repelentes do seu óleo essencial, que já foram caracterizadas quanto a resistência das plantas contra pragas, herbívoros, fungos e bactérias (CAMPOS et al., 2019). No entanto, mosca branca, cochonilhas e os ácaros podem infestar as plantas e se tornarem um problema. Da mesma forma, a presença de doenças não é comum em tomilho. No entanto, em ambientes mais úmidos, com pouca drenagem, a podridão da raiz causada principalmente por bactérias do gênero *Rhizoctonia* pode causar problemas sérios. Algumas doenças fúngicas também são relatadas na literatura, porém com menor frequência, tais como ferrugem, *Alternaria* spp. e o *Botrytis* spp. (DAFF, 2012).

A colheita do tomilho é fator primordial para se garantir a qualidade do produto e manutenção do cultivo da planta. Período de colheita muito longo ou curto demais pode resultar na morte da planta, particularmente em ambientes mais úmidos onde a susceptibilidade à doença é maior. Portanto, a colheita deve ser frequente e a altura de corte ajustada para deixar

algumas hastes e folhas vivas nas plantas após o corte. Na extração do óleo essencial, o tomilho é colhido uma vez por ano, no final do verão, quando a floração começa. Em certas condições, são possíveis duas colheitas por ano. Na produção de matéria seca, a colheita de caules e folhas, se inicia com o começo da floração, cortando a planta a cerca de 10 a 15 cm acima do solo. Para os produtos frescos, colhem-se apenas as pontas dos ramos, onde as hastes se encontram menos lignificadas (DAFF, 2012).

O tomilho é amplamente utilizado como erva condimentar e na medicina popular, principalmente na forma seca. O produto seco deve ser processado para a separação das folhas e hastes (PRASANTH et al., 2014). Muitas estratégias são empregadas para se secar em condição de pleno sol, entretanto resultam em perda de qualidade do óleo essencial. O tomilho deve ser seco a temperaturas não superiores a 40 °C para reduzir a perda de sabor através da volatilização da fração volátil do óleo essencial e manter uma cor característica (PRASANTH et al., 2014).

### **2.1.3 Propriedades medicinais e funcionais do tomilho**

As propriedades farmacológicas de diferentes extratos e dos óleos essenciais do tomilho já foram bem caracterizadas. Dessa forma, essas informações trouxeram contribuições significativas para as indústrias (principalmente como aditivo de alimento) e aplicações medicinais da planta (JAKIEMIU, 2008; NABAVI et al., 2015). Na verdade, os óleos essenciais do tomilho oferecem um grande potencial para uso como conservantes de alimentos para atrasar a oxidação de lipídios durante o manuseio, processamento e armazenamento de alimentos (COSTA et al., 2015). Seu óleo também encontrou aplicações na produção de cosméticos, como desodorantes, cremes dentais e enxaguatórios bucais (TOHIDI et al., 2019).

O tomilho contém muitos flavonoides e antioxidantes fenólicos como zeaxantina, luteína, apigenina, naringenina, luteolina e timonina (DAUQAN; ABDULLAH, 2017). Além de possuir um dos maiores níveis de antioxidantes em comparação a espécies do mesmo gênero, suas folhas são uma das fontes mais ricas de potássio, ferro, cálcio, manganês, magnésio e selênio (SHARANGI; GUHA, 2013). Tem sido utilizada há milhares de anos para tratar alopecia, placa dentária, infecções dermatófitas, bronquite, tosse, distúrbios inflamatórios da pele e distúrbios gastrointestinais (DAUQAN; ABDULLAH, 2017).

O óleo essencial de tomilho é responsável pelo aroma picante típico e é um dos dez principais conservantes de alimentos do mundo (STHAL-BISKUP; SAEZ, 2002). Os principais constituintes fitoquímicos do tomilho incluem fenólicos, terpenoides e saponinas (EKOH et al., 2014; KUETE, 2017). O óleo essencial de tomilho possui alto teor de monoterpenos oxigenados

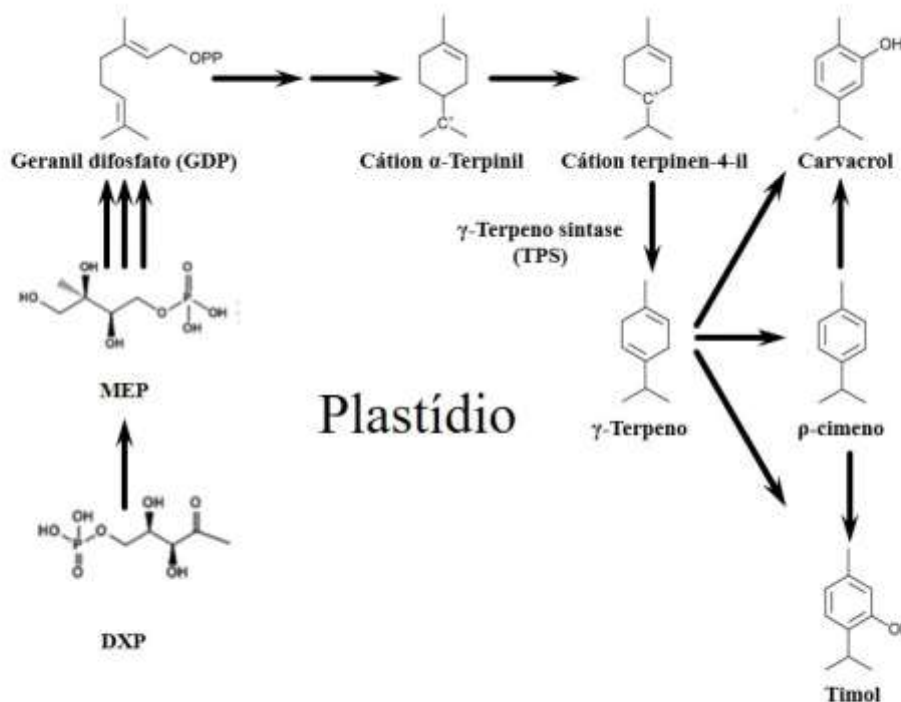
( $\pm 57\%$ ) e menor proporção de hidrocarbonetos monoterpênicos ( $\pm 29\%$ ), além de possuir hidrocarbonetos sesquiterpênicos ( $\pm 5\%$ ) e sesquiterpenos oxigenados ( $\pm 2\%$ ) (REDDY et al., 2014; KUETE, 2017).

Guillen e Manzanos (1998) observaram variações na composição e rendimento no óleo extraído de tomilho em diferentes partes da planta. O teor obtido das folhas e das flores é muito mais elevado do que aquele obtido das hastes, sendo encontrados de 1- 4%, 1 - 2,5% e 0-0,5%, respectivamente, em folhas, flores e hastes (GUILLEN; MANZANOS, 1998; STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2012). Isso se deve porque o óleo essencial é produzido e armazenado em células secretoras especiais (tricomas glandulares) não uniformemente distribuídas nas partes aéreas da planta; além disso, seu estágio secretor depende do estágio de desenvolvimento do material vegetal e da variação sazonal (KHOSHOKHAN et al., 2014; MAJDI et al., 2017).

Os fenóis predominantes no óleo extraído de *T. vulgaris* são timol e carvacrol, podendo chegar a proporções de até 65% de timol e 85% de carvacrol (THOMPSON et al., 2003; PORTE; GODOY, 2008; SATYAL et al., 2016). Quando se fala na natureza fenólica do gênero *Thymus*, duas possibilidades biossintética podem levar a dar origem ao timol e o carvacrol bem como seus derivados e precursores (Ex:  $\gamma$ -terpineno e *p*-cimeno) (LLORENS et al., 2014; TOHIDI et al., 2019), conforme ilustra a figura 2.

Esses dois monoterpênicos oxigenados (timol e carvacrol) são biossintetizado a partir da via MEP (metil-eritritol-fosfato) localizada em plastídeos, onde o 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) é irreversivelmente convertido em 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (MAJDI et al., 2017). Posteriormente, o difosfato de isopentenil (IDP) e seu isômero difosfato de dimetilalil (DMADP), que são ambos sintetizados do MEP, são condensados cabeça-a-cauda formando o geranyl difosfato (GDP) que é o precursor usual dos monoterpênicos (CROCOLL, 2011). Subsequentemente, a  $\gamma$ -terpineno sintase, que é um membro da família da monoterpêno sintase, produz  $\gamma$ -terpineno por meio da ciclização de GDP. A partir do  $\gamma$ -terpineno duas possibilidades biossintéticas podem levar a dá origem ao timol e o carvacrol (TOHIDI et al., 2019). A via tradicional sugere uma sequência biossintética pelo qual  $\gamma$ -terpineno dá origem a *p*-cimeno, que por sua vez origina timol e carvacrol (THOMPSON et al., 2003). Por outro lado, também se sugere que o timol e carvacrol são formados diretamente do  $\gamma$ -terpineno através de uma oxidação em duas etapas, sendo o *p*-cimeno formado como um produto secundário, resultante da liberação prematura do substrato a partir do sítio ativo da enzima (CROCOLL et al., 2010) (Figura 2).

Figura 2 - A via biossintética do timol/carvacrol em *T. vulgaris* L. DXP (1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato), MEP (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato).



Fonte: Adaptado de Majdi et al (2017), Rudolph et al., (2015) e Lima et al. (2013).

Além do timol e carvacrol, os principais constituintes do óleo essencial incluem linalol, mirceno, cânfora, borneol,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -cariofileno, *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, éter timilmetílico, éter carvacrilmetílico, limoneno,  $\alpha$ -terpinol,  $\gamma$ -terpinol e hidrato de sabineno (KUETE, 2017; TOHIDI et al., 2019; KOSAKOWSKA et al., 2020). Outrora, o tomilho também contém ácidos fenólicos, como o ácido rosmarínico, ácido caféico, ácido gentísico, ácido *p*-cumárico, ácido singárico, ácido ferúlico e ácido *p*-hidroxibenzóico (STAHL-BISKUP; VENSKUTONIS, 2012; KUETE, 2017; KOSAKOWSKA et al., 2020). Dessa forma, existem variações em seu perfil químico que categorizam esta espécie com pelo menos 20 quimiotipos diferentes (Satyal et al., 2016).

O óleo essencial de tomilho possui atividades antimicrobianas, carminativa e expectorante, atividades estas atribuídas ao timol e ao carvacrol, sendo timol o mais potente (TOHIDI et al., 2019; KOSAKOWSKA et al., 2020). As atividades antifúngicas, pesticidas e antibacterianas do óleo essencial de tomilho foram demonstradas por Roby et al. (2013), Nikolic et al. (2014), Keramat et al. (2016) e Dauqan e Abdullah (2017). Atividades anti-



espasmolíticas, bem como, antioxidantes foram relatadas também para o extrato alcoólico da planta (HUDAIB et al., 2002).

Estudos fitoquímicos investigaram a composição do óleo essencial do tomilho, de fontes e de genótipos diferentes, bem como a sua variação em estações diferentes e durante o ciclo vegetativo da planta (HUDAIB et al., 2002; TOHIDI et al., 2019). Dessa forma, variações da composição e rendimento do óleo essencial extraído têm sido reportadas, estando essas associadas a inúmeros fatores, como diferentes partes da planta, condições climáticas, tipo de cultivo, propriedades do solo, época de colheita, características genéticas da planta, adubação e, até mesmo, condições de armazenamento e secagem e aplicações de insumos agrícolas (VENSKUTONIS et al., 1996; TOHIDI et al., 2019; KOSAKOWSKA et al., 2020).

## **2.2 Qualidade e intensidade de luz**

### **2.2.1 Papel da luz nas plantas**

A luz é o principal fator no controle do crescimento e desenvolvimento das plantas, que são afetadas de maneira complexa pela irradiação em todos os estágios de seu desenvolvimento. A arquitetura das plantas é dependente da quantidade, da direção, da duração e da qualidade de radiação. A radiação solar regula fatores fundamentais no vegetal como fotossíntese, temperatura foliar, pigmentos, dentre outros e, é um fator chave na produção final de muitos compostos, porque fornece a energia necessária para fixar o carbono (CHANG; ALDERSON; WRIGHT, 2008). Dessa forma, variações no espectro de radiação podem condicionar diferentes respostas fisiológicas que acarretam modificações em suas características bioquímicas, morfológicas, anatômicas e de crescimento das plantas (BERGAMASCHI; BERGONCI, 2017).

Na planta, um complexo de fotorreceptores e outros pigmentos (por exemplo, clorofilas, carotenoides, fitocromos, criptocromos, fototropinas), podem captar variações tanto na intensidade como na qualidade de luz, adaptando seu desenvolvimento às condições a que estão expostas (AFREEN et al., 2005; BUTHELEZI et al., 2016). Para a medição da luz, quatro fatores são importantes: a qualidade espectral, a intensidade, a duração e a direção (CHANG et al., 2008; TAIZ et al., 2017). O espectro eletromagnético determina a qualidade da luz, representado pelos fótons de diferentes comprimentos de onda e energia. A luz se propaga na atmosfera através de ondas cuja capacidade energética varia de acordo com o espectro (COSTA et al., 2012).

A literatura expõe três classes de fotorreceptores consideradas principais. Criptocromos e fototropinas, que absorvem luz nas regiões do azul, e ultravioleta; e os fitocromos, que absorvem luz nas regiões do vermelho e vermelho distante (NIEMI et al., 2005). Os mecanismos pelos quais tais fotorreceptores regulam as respostas das plantas ainda foram pouco elucidados e demanda de maiores esclarecimentos para melhor compreensão do papel da luz nas plantas (TAIZ et al., 2017).

A luz azul permite às plantas alterarem o seu crescimento, desenvolvimento e a sua formação como um todo, sendo apontada como extremamente importante para as plantas se aclimatarem às condições ambientais. A fisiologia das respostas é bastante variável entre a espécies vegetais e inclui fototropismo, movimentos estomáticos, inibição do alongamento celular, ativação de genes, biossíntese de pigmentos, acompanhamento do sol pelas folhas e movimento dos cloroplastos dentro das células. As respostas específicas podem ser distinguidas por um espectro de absorção característico de três bandas na região de 400 a 500 nm (COSTA et al., 2012; TAIZ et al., 2017).

Por outro lado, a luz vermelha exerce influência mais forte e seus efeitos podem ser revertidos pela luz vermelho-distante, estando muito relacionado com os fitocromos. Nos fenômenos fotomorfogênicos, o fitocromo é um pigmento encontrado dissolvido no hialoplasma das células vegetais, captando específicos comprimentos de onda, ocorrendo em duas formas, o que absorve a luz vermelha, 650 a 680 nm, e o que absorve a luz vermelha-distante, 710 a 740 nm (COSTA et al., 2012). Dentre os inúmeros efeitos da luz vermelha sob as plantas pode-se destacar: promove a germinação, o desestiolamento, a formação do primórdio foliar, o desenvolvimento de folhas primárias, a produção de antocianinas, a replicação dos plastídios, a orientação dos cloroplastos em relação à luz fraca direcional, inibe o alongamento de entrenó e o florescimento (resposta fotoperiódica) e aumenta a taxa de acumulação de clorofila e amido (COSTA et al., 2012; TAIZ et al., 2017).

### **2.2.2 Resposta das plantas a qualidade e intensidade de luz**

Vários estudos têm apontado que a alta intensidade de luz é o principal fator que causa a diminuição da área foliar de plantas e conduz a alterações anatômicas primárias como a diminuição do tamanho da célula, as paredes celulares mais espessas e cutículas, e um parênquima paliádico fortemente desenvolvido à custa de uma diminuição do parênquima esponjoso (ALVAREZ et al., 2012). Estas alterações morfológicas influenciam vários processos fisiológicos, associados, principalmente, à fotossíntese e transpiração. De acordo com Macedo et al. (2011), o espectro azul aumenta a espessura da epiderme e as células do

parênquima paliçádico, enquanto que o espectro vermelho diminuiu a espessura dos tecidos da face abaxial e do parênquima esponjoso.

A luz é necessária para a biossíntese de compostos secundários como flavonoides e outros compostos fenólicos. A formação dos flavonoides, por exemplo, é dependente da irradiância recebida no ambiente de desenvolvimento vegetal e sua taxa de biossíntese está relacionada tanto à intensidade quanto à qualidade (GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011). Em *Kalanchoe pinnata*, altas irradiâncias com comprimento de onda na região do azul promoveram aumento na quantidade de compostos fenólicos com alta atividade antioxidante (quercetina e quercitrina), sendo uma resposta da planta a um estresse promovido por este comprimento de onda (NASCIMENTO et al., 2013). Em *Labisia pumila*, ocorreu um aumento de compostos fenólicos (ácido gálico) em condições de alta irradiância sendo este aumento relacionado à estimulação da fenilalanina amonia-liase (KARIMI et al., 2013).

As plantas apresentam respostas diversificadas de crescimento em relação a alterações de irradiância. *Artemisia vulgaris* apresentou maior produção de matéria seca quando cultivada em ambientes que recebem altas irradiâncias na região do azul (COSTA et al., 2012); *Catharanthus roseus* produziu maior matéria seca em ambientes com espectros de irradiâncias na região do vermelho (MELO; ALVARENGA, 2009). *Mikania glomerata* apresentou maior matéria seca em ambientes com baixas irradiâncias (ESPINDOLA-JUNIOR et al., 2009). A maior produção de matéria seca de *Labisia pumila* foi observada em altas irradiâncias (KARIMI et al., 2013).

### 2.2.3 Uso de malhas de sombreamento

A radiação excessiva é um problema para algumas regiões do planeta ou mesmo em determinadas estações do ano, por causarem danos ao aparato fotossintético das plantas. Esse problema ocorre, porque a assimilação líquida máxima de CO<sub>2</sub> da maioria das espécies C3 satura a uma irradiância relativamente baixa (600-900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), correspondendo a 30-40% da luz solar total em um dia típico de cultivo (1500-2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ou até mais altos em determinadas regiões) (ILIC; FALLIK, 2017). Assim, esse excesso de energia radiante pode predispor as plantas à fotoinibição, estresse por calor e fechamento estomático, levando a uma redução na fotossíntese líquida, que é a fonte final de substrato de carboidrato para o crescimento (ILIC; FALLIK, 2017). Além disso, altas temperaturas sustentadas (35–40 °C) como resultado da alta radiação solar pode prejudicar processos fisiológicos na planta como a divisão celular, a expansão foliar, e o desenvolvimento dos meristemas apicais e laterais (FLAISHMAN et al., 2015).



Com base nessas informações disponíveis na literatura, surgiram no mercado as malhas coloridas e termorefletoras que visam alterar o comprimento de onda e quantidade de energia disponível às plantas. Nesse sentido, os materiais de cobertura fotosselativa, como malhas de sombra, buscam proteger as plantas contra temperaturas excessivas e alta radiação solar, mas também contra granizo, pássaros, pragas e melhorar a qualidade de vegetais e culturas de ervas (ILIC; FALLIK, 2017; MILENKOVIĆ et al., 2019). Essas malhas de sombra são projetadas para modificar a luz nas regiões espectrais ultravioleta, visível ou vermelho-distante, regulando simultaneamente o crescimento da planta, o desenvolvimento e a biossíntese de metabólitos (ILIC et al., 2017; MILENKOVIĆ et al., 2019). As características dessas malhas são determinadas pelo tipo de rede de sombra, cor, molde, textura e tipo de material, bem como a densidade de sua malha (KOTILAINEN et al., 2018; DÍAZ-PÉREZ; JOHN, 2019). Embora as malhas pretas sejam as mais comumente usadas, tem havido um interesse crescente na utilização de malhas coloridas (DÍAZ-PÉREZ et al., 2020).

Várias pesquisas relatam o efeito significativo dessas malhas em filtrar a luz solar incidente, de acordo com cada cor de tela utilizada. A malha de sombra de cor preta é considerada neutra; tendo a característica de reduzir a radiação incidente sobre as plantas sem influenciar a qualidade do espectro de luz (COSTA et al., 2018). A malha azul, tem a vertente de filtrar as ondas na faixa do vermelho e do vermelho distante, sendo possível a passagem de ondas entre 400–540 nm que corresponde a região do azul-verde (SHAHAK et al., 2004; COSTA et al., 2012). Já as malha de sombra vermelha reduzem as ondas de luz azul, verde e amarela, aumentando o espectro de onda da luz vermelha e vermelha distante e com transmitância para comprimentos de onda superiores a 590 nm (COSTA et al. 2012; 2018; RIBEIRO et al., 2018). Díaz-Pérez e John (2019) trabalhando com malhas pretas (47%), vermelho (42%), prata (40%) e branco (41%) relataram que as malhas de sombra afetam a qualidade e a quantidade da radiação solar recebida pela cultura, bem como menor temperatura do ar e do solo (na zona radicular das plantas ao meio-dia) sob o cultivo em malhas.

Descobriu-se que as malhas coloridas influenciam positivamente o crescimento das plantas e a produção de frutos de hortaliças importantes (DÍAZ-PÉREZ et al., 2020). No pimentão e no tomate, as malhas de sombra coloridas têm demonstrado aumentar a produção e a qualidade dos frutos, como a redução da incidência de distúrbios fisiológicos (OMBODI et al., 2015; ILIC et al., 2017; SIVAKUMAR et al., 2018; DÍAZ-PÉREZ et al., 2020). Foi demonstrado também que as malhas coloridas perola, vermelha, azul e preta influenciam positivamente a produção quali-quantitativa de alface, onde o peso e diâmetro da cabeça e o índice de área foliar foram maiores, o período do plantio foi significativamente mais curto e

folhas com melhor cor e textura (ILIC<sup>Ć</sup> et al., 2017; SIVAKUMAR et al., 2018; MASTILOVIĆ et al., 2019). Bankar et al., (2017) observaram que a malha de sombreamento vermelha (35% de intensidade de sombreamento) foi a mais adequada para obter crescimento máximo significativo, com maior produção de biomassa total e de vagens de feijão verde; seguido da malha de cor verde + branco.

Entretanto, os efeitos das malhas de sombra coloridas nas culturas nem sempre são consistentes e podem variar dependendo da espécie utilizada e das condições ambientais (DÍAZ-PÉREZ et al., 2020). Russo e Honermeier (2017) relataram que o sombreamento moderado não influenciou positivamente a produtividade foliar e os parâmetros de crescimento investigados de *Melissa officinalis* L., dentre os quais o teor de óleo essencial. Portanto, os autores concluíram que o uso de malhas de sombreamento com redução moderada de luz não é vantajoso para o cultivo de erva-cidreira em condições de clima temperado.

Por outro lado, mesmo que as malhas de sombreamento coloridas já sejam pesquisadas em considerada proporção pela literatura, há informações limitadas sobre a influência da qualidade espectral de malhas fotosseletivas sobre o conteúdo fitoquímico, principalmente quando se fala em ervas medicinais, condimentares e aromáticas (BUTHELEZI et al., 2016; KOTILAINEN et al., 2018; DÍAZ-PÉREZ; JOHN, 2019). Em cultura importante como o alface (ILIC<sup>Ć</sup> et al., 2017; SIVAKUMAR et al., 2018; MASTILOVIĆ et al., 2019), pimentão, tomate, (SIVAKUMAR et al., 2018; DÍAZ-PÉREZ; JOHN, 2019; DÍAZ-PÉREZ et al., 2020) e ervas condimentares como orégano, manjerona e coentro (BUTHELEZI et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017; SIVAKUMAR et al., 2018) foi demonstrado que as malhas coloridas influenciam positivamente no teor de fenóis totais, flavonoides, teor de ácido ascórbico e atividade antioxidante total nas folhas. Neste contexto, estudos que buscam analisar o efeito de diferentes condições de radiação no conteúdo fitoquímico das plantas são de extrema importância (KARIMI et al., 2013).

Em *T. vulgaris* especificamente, as informações de cultivo sob malhas coloridas são praticamente inexistentes. Um dos raros exemplos é o trabalho de Zrig et al. (2016) que avaliou o tomilho em apenas uma condição de sombreamento (malha preta a 28% de sombreamento) e identificou mudanças quanti-qualitativas em óleos essenciais, aminoácidos e polifenóis. Nesse sentido, pesquisas sobre a manipulação de luz em sistemas de cultura de tomilho se faz necessário para a melhoria da produção desse vegetal, principalmente em condições de estufa, de olho na sustentabilidade e voltado para atender a demanda dos consumidores por vegetais de alto valor nutritivo e farmacológico durante todo o ano.

## 2.3 Adubação Orgânica

A sustentabilidade ambiental, social e econômica dos sistemas de produção agrícola tem sido foco de todo o mundo. A idealização de um sistema de produção que consiga reduzir o uso de insumos através do reaproveitamento de resíduos, tem sido o foco de pesquisas, tanto de órgãos de caráter público, como privado, em pequenas ou grandes propriedades (PINTO, 2018). Neste sentido, a busca por fontes alternativas de fertilizantes tem sido um dos desafios da agricultura mundial, e principalmente a Brasileira. Isto porque cerca de 70% das fontes de fertilizantes utilizadas na agricultura são importadas, podendo chegar a 90%, como no caso do K, colocando assim o país em uma situação de vulnerabilidade econômica, principalmente pelo aumento crescente do consumo de insumos e pelas flutuações do dólar (MARIN et al., 2016; PINTO, 2018).

O sistema orgânico de produção ou agricultura orgânica teve sua ascensão na era moderna, no início do século XX, com metodologias propostas pelo inglês Albert Howard, que fez pesquisa agrícola na Índia, por quase 40 anos (PENTEADO, 2001). Uma das principais diferenças entre o sistema de produção orgânica e convencional é a abordagem da nutrição das plantas (MARGENAT et al., 2020). A nutrição mineral é um fator essencial de manejo de plantas, pois influencia diretamente no crescimento e no desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, no incremento de produtividade (PES; ARENHARDT, 2015). A adubação orgânica compreende o uso de resíduos orgânicos de origem natural, animal, vegetal, agroindustrial e outros, com a finalidade de incrementar no sistema uma fonte de nutriente, e recursos relacionados, com o propósito de aumentar a produtividade das culturas com o foco na sustentabilidade (GOVAHI et al., 2015; MÖLLER, 2018).

### 2.3.1 Uso de esterco como fertilizante orgânico

A estratégia orgânica de cultivo, busca trazer para o quesito de nutrição das plantas, uma abordagem com o objetivo de manter o equilíbrio do sistema e ser a base de uma agricultura mais sustentável (MARGENAT et al., 2020). A aplicação de matéria orgânica no solo influencia positivamente as qualidades físicas, químicas e biológicas, principalmente microrganismos. Esses benefícios podem variar com o estágio de decomposição, mineralização, solubilização no solo e da dose e fonte do material utilizado (GOVAHI et al., 2015). Os fertilizantes orgânicos são o produto de processo físico, químico, físico-químico ou bioquímico, natural ou controlado, a partir de matérias primas de origem vegetal ou animal, industrial, urbana ou rural, enriquecido ou não de nutrientes minerais (ALCÂNTARA, 2016).

Didaticamente, aqui no Brasil, os fertilizantes orgânicos são categorizados como: Fertilizante orgânico simples (estercos animais; torta de filtro de cana; vinhaça de cana; palhadas de milho e de soja, serragem de madeira; casca de pinus, eucalipto, café e arroz; farinha de ossos, casco, chifres, e sangue; torta de mamona; e as cinzas de madeira); Fertilizante orgânico composto (Compostagem, biofertilizantes, lodo de esgoto; vermicomposto, composto de lixo, etc.); Fertilizante orgânico misto (Organomineral, Bokashi, etc.) e Adubação verde (TRANI et al., 2013; ALCÂNTARA, 2016).

Além disso, a legislação brasileira classifica os fertilizantes orgânicos de acordo com as matérias-primas utilizadas na sua produção, conforme descreve o art3º da INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 61, DE 8 DE JULHO DE 2020 (BRASIL, 2020). Dessa forma, duas classes são adotadas, a classe “A” cujo matéria-prima utilizada é originária de atividades extrativas, agropecuárias, industriais, agroindustriais e comerciais, incluindo aquelas de origem mineral, vegetal, animal, lodos industriais e agroindustriais de sistema de tratamento de águas residuárias com uso autorizado pelo Órgão Ambiental, resíduos de frutas, legumes, verduras e restos de alimentos gerados em pré e pós-consumo. E a classe “B” que adotam como matérias-primas orgânicas produtos das atividades urbanas, industriais e agroindustriais, incluindo a fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos da coleta convencional, lodos gerados em estações de tratamento de esgotos, lodos industriais e agroindustriais gerados em sistemas de tratamento de águas residuárias contendo qualquer quantidade de despejos ou contaminantes sanitários, todos com seu uso autorizado pelo Órgão Ambiental

Dentre as variadas fontes de fertilizantes orgânicos, os estercos se destaca por ser o mais encontrado nas diferentes regiões do Brasil e do mundo, podendo ser aproveitado de uma gleba muito grande de animais. Dentre as diferentes espécies de animais que se destacam na produção de esterco, em escala considerável e de uma forma que se possa aproveitar, temos o bovino, equino, suíno, caprino, ovino, de coelhos e aves (TRANI et al., 2008; ALCÂNTARA, 2016; BIBIANO, et al. 2019). A produção média diária de esterco desses animais é bem significativa. Um bovino produz em média de 10 a 15 kg de esterco por dia, um suíno produz em média 2,35 kg de esterco diário, um caprino adulto de 0,6 a 1,6 kg esterco por dia. As aves, em sistema de produção intensivo, produz aproximadamente 100g de esterco + urina (TRANI et al., 2008; PINTO et al., 2014; SILVA; DEL VALLE, 2018).

O esterco bovino, disponível em maior quantidade, é o mais estudado e utilizado na agricultura. Por outro lado, o esterco avícola, como o de galinha e codorna, e de ovinos e caprinos tem ganhado espaço por ter aumentado sua produção significativamente nos últimos anos. Esses fertilizantes orgânicos têm se mostrado uma boa fonte de nutrientes, especialmente

de nitrogênio e quando administrada de forma adequada, pode fornecer parte ou toda a quantidade de nutriente necessário para o cultivo de qualquer espécie (BLUM et al., 2003; BIBIANO et al. 2019; ZHU et al., 2020; HAFIZAH et al., 2020). Melo et al. (2008) ao caracterizarem a matriz orgânica de amostras de lodo de esgoto, esterco de galinha, suíno, codorna e bovino, além de composto, substrato orgânico e material húmico comercial, verificaram que os esterco de galinha e de codorna foram os mais ricos em ácidos orgânicos. Essas mesmas fontes apresentaram elevados teores de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$ , indicando assim, uma fonte imediata e prontamente disponível de nitrogênio (N) para as plantas.

As principais vantagens do uso de esterco como fertilizantes são: disponibiliza os nutrientes de forma gradativa e evita as perdas de minerais por lixiviação, prolongando assim os efeitos da adubação; melhoria da estrutura do solo; diminuição dos processos de compactação do solo; melhoria da aeração e da drenagem do solo; aumento da capacidade de armazenagem de água no solo; diminuição dos efeitos da erosão; disponibilização de nutrientes; elevação da capacidade de troca cátions (CTC) do solo; melhora da condição de crescimento de raízes; contribuição para o controle do pH em solos; aumento da biodiversidade no solo, essencial para o controle de pragas e doenças (DEMARTELAERE et al., 2020).

Uma das características mais importantes dos esterco animais é a redistribuição dos nutrientes no espaço e no tempo dentro do sistema de cultivo, oferecendo assim uma ferramenta estratégica para gerenciar o suprimento de nutrientes para o cultivo de espécies vegetais (MÖLLER, 2018). Por outro lado, é preciso ficar atento há algumas características dos esterco, dentre elas o estágio de curtimento do esterco, dose e a fonte do material utilizado (GOVAHI et al., 2015; BIBIANO, et al. 2019). A dosagem de esterco e outros resíduos orgânicos a ser adicionada em determinada solo ou substrato depende, entre outros fatores, da composição e do teor nutricional de matéria orgânica dos referidos resíduos, classe textural e nível de fertilidade do solo, exigência nutricional e espaçamento da cultura explorada e condições climáticas regionais (TRANI et al., 2013; DEMARTELAERE et al., 2020). Neste sentido, é muito importante estudar com profundidade o uso de compostos orgânicos como fertilizantes, a fim de ajustar tratamentos culturais que consigam entregar o melhor resultado e otimizar e viabilizar sua utilização.

### **2.3.2 Melhoria das características do solo com a utilização da adubação orgânica**

Os fertilizantes orgânicos são insumos, que de modo geral, são de baixo custo associados a propriedades desejáveis do solo, incluindo a melhoria das propriedades químicas, física e biológicas do solo (NOVAIS et al., 2007). O princípio básico que rege a adubação

orgânica é a ativação e manutenção da vida do solo. Ao fornecer os nutrientes essenciais e a energia necessária para que os ciclos biogeoquímicos naturais sejam estimulados e consequentemente otimizados, regendo assim todo o ciclo biológico que mantém o equilíbrio do ecossistema terrestre (DEMARTELAERE et al., 2020).

Os principais efeitos benéficos dos fertilizantes orgânicos sobre as propriedades físicas do solo são: aumento na estabilidade de agregados e melhoria na estrutura do solo que consequentemente implica em melhor aeração, permeabilidade, retenção de água e resistência à erosão; favorecem a diminuição das variações bruscas de temperatura do solo que interferem nos processos biológicos do solo e na absorção de nutrientes pelas plantas (TRANI et al., 2013; AGEGNEHU et al., 2015). Já nas propriedades químicas, por meio do fornecimento de macronutrientes e micronutrientes essenciais às plantas e o aumento gradativo do teor de matéria orgânica do solo, implicando assim no aumento da capacidade de troca catiônica (CTC), formação de complexos e aumento do poder tampão (TRANI et al., 2013). E ainda, sobre as propriedades biológicas do solo pelo aumento da atividade biológica, aumento na biodiversidade de microorganismos úteis que agem na solubilização de fertilizantes diversos de maneira a liberar nutrientes para as plantas e também aumento na quantidade de microorganismos que auxiliam no controle de pragas e doenças das plantas (TRANI et al., 2013). Por conseguinte, é notório observar que as melhorias das características do solo proporcionada pelo incremento de matéria orgânica oriundo dos fertilizantes orgânicos são o produto das interações entre os diversos componentes do sistema como um todo (NOVAIS et al., 2007).

Além do exposto, geralmente, o transporte da maioria dos contaminantes no solo é controlado principalmente por sua taxa de absorção e fixação nas superfícies das partículas do solo, principalmente os coloides e a matéria orgânica dissolvida, o que reduz sua disponibilidade para absorção pelas plantas (AHMADABADI et al., 2019, 2021). Dessa forma, o uso de fertilizantes orgânicos tem demonstrado um papel importante na redução do efeito tóxico de vários contaminantes do solo, dentre eles destacam-se alguns metais pesados, como Cr, Pb, Cd, As e Hg e antibióticos liberados no solo (TEIXIDO et al., 2011; AHMADABADI et al., 2019, 2021).

### **2.3.3 Respostas das plantas medicinais à adubação orgânica**

Tendo uma vez decidido cultivar qualquer espécie de planta, a decisão sobre seu cultivo sob o sistema orgânico é influenciada por alguns fatores, dentre os quais podemos destacar a experiência do produtor, disponibilidade de recursos e informações sobre outros fatores

complementares desse sistema, tais como os tratos culturais (BADALINGAPPANAVAR et al., 2019). A maioria dos produtores de plantas medicinais, aromáticas e condimentares conhece a importância do cultivo em condições orgânicas, entretanto, ainda existe uma carência no setor de pesquisas que comprovem e otimizem o cultivo dessas espécies sob sistema orgânico de produção (MALIK, 2014; KAZIMIERCZAK et al., 2014; BADALINGAPPANAVAR et al., 2019).

Dentre os tratos culturais que são essenciais para maximizar a produção das culturas, a adubação é a base para qualquer sistema de cultivo. Isso se deve pela interferência direta da adubação no estado nutricional das plantas e conseqüentemente em todos os aspectos envolvidos no crescimento e desenvolvimento, dentre os quais pode-se destacar os metabólitos secundários (COSTA et al., 2012; BISTGANI et al., 2018; MAHDAVI et al., 2020). Dessa forma, o conhecimento sobre as propriedades nutricionais e físico-químicas de resíduos orgânicos, bem como o seu manejo de cultivo, pode ajudar a determinar as proporções destes materiais para a produção de substrato e meio adequados para a otimização do cultivo das plantas (HIGASHIKAWA; SILVA; BETTIOL, 2010).

As plantas medicinais, aromáticas e condimentares, como em qualquer outra cultura, dependem de suprimento adequado de nutrientes para boas produtividades agrícolas e de compostos de interesse (SANTOS, 2012; KAZIMIERCZAK et al., 2010; 2011; 2014; BADALINGAPPANAVAR et al., 2019). Neste sentido, a nutrição mineral das plantas advinda da adubação orgânica tem se destacado no cultivo de espécies medicinais e condimentares, porque as composições nutricionais das plantas variam muito e os fertilizantes orgânicos conseguem atender uma grande diversidade de plantas sem ser tóxicos ou causar deficiências (Bibiano, et al. 2019), e principalmente por ajudar a atender os critérios de controle de qualidade, não possuindo resíduos de produtos químicos nocivos para saúde humana (ZANDVAKILI et al., 2017).

A literatura tem apontado que a aplicação de fertilizantes orgânicos afeta positivamente o crescimento e desenvolvimento de plantas medicinais e condimentares, como também a produção e composição de seu óleo essencial e até mesmo sobre o estresse oxidativo (BONACINA et al., 2017; BISTGANI et al., 2018; BIBIANO, et al. 2019; MAHDAVI et al., 2020). Bibiano et al. (2019) relataram que as doses de esterco bovino, de galinha e codorna influenciaram, significativamente, na produção de biomassa das plantas, no teor, no rendimento e na composição química do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. Esses pesquisadores concluíram que o esterco de codorna, na dose de 8,93 kg m<sup>-2</sup>, apresentou maior eficiência na produção de biomassa seca total em relação aos demais fertilizantes utilizados.

Trabalhando com hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), salva (*Salvia officinalis* L.), erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) cultivadas em condições orgânicas (Adubado com esterco equino) e convencionais (Adubação química) em dois anos consecutivos, Kazimierczak et al (2014) identificaram que o sistema orgânico incrementou significativamente a massa seca total, vitamina C, ácidos fenólicos e flavonoides totais do que as plantas cultivadas convencionalmente. Adubando com esterco bovino, vermicomposto e torta de mamona plantas de Kalmegh (*Andrographis paniculata*) apresentaram maior rendimento de biomassa e dos compostos bioativos, o que foi significativamente correlacionado com as propriedades do solo (Fertilidade e as propriedades biológicas do solo) (BASAK et al., 2019).

Nesse sentido, há pesquisas que relataram respostas positivas de *Thymus vulgaris* à adubação orgânica com compostagem, biofertilizantes, pó de rocha fosfática e esterco de gado, ovelha e galinha (ATEIA et al., 2009; HENDAWY et al., 2010; SKUBIJ; DZIDA, 2015). Hendawy et al. (2010) concluíram que plantas de tomilho incrementaram o crescimento, o rendimento e os constituintes do óleo essencial quando submetida a algum tipo de fertilizante orgânico, independente da época do ano. Skubij e Dzida (2015) observaram aumento significativo no teor de N-total e proteínas em tomilho após a aplicação de doses crescentes de esterco bovino, independentemente do tipo de substrato utilizado.

Embora o efeito de diferentes fertilizantes orgânicos e químicos no aumento da produtividade e propriedades fitoquímicas de plantas medicinais, aromáticas e condimentares, tenha sido documentado, nos últimos anos, algumas espécies como *T. vulgaris* são poucos e insuficientes os estudos nessa área (KAZIMIERCZAK et al., 2014; BADALINGAPPANAVAR et al., 2019). Até onde sabemos, não há atualmente nenhuma pesquisa publicada sobre as respostas fitoquímicas e vegetativas de tomilho adubadas organicamente com esterco de codorna e caprino. Além disso, de modo geral em plantas medicinais, aromáticas e condimentares há pouca informação sobre os efeitos desses fertilizantes na fisiologia e produção quanti-qualitativa de óleo essencial e compostos químicos, como também sobre a atividades antioxidantes (NOROOZISHARAF; KAVIANI, 2018; DZIDA et al., 2019).

Já existe informação suficiente para cravar que o cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares pelo sistema orgânico de produção são a melhor opção para cultivo dessas espécies (BADALINGAPPANAVAR et al., 2019). Entretanto, projetar um sistema de agricultura orgânica que una princípios de sustentabilidade e produtividade em grande escala é complexo e exigem profundidade em termos de conhecimento (BADALINGAPPANAVAR et



al., 2019). A adubação é a base de qualquer sistema de cultivo de plantas, e compreender suas vertentes é a chave para a consolidação de toda a cadeia produtiva de plantas medicinais, aromáticas e condimentares.

### Referências Bibliográficas

AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Spectral quality and UV-B stress stimulate glycyrrhizin concentration of *Glycyrrhiza uralensis* in hydroponic and pot system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1074-1081, 2005.

AGEGNEHU, G. et al. The ameliorating effects of biochar and compost on soil quality and plant growth on a Ferralsol. **Soil Research**, v. 53, n. 1, p. 1-12, 2015.

AHMADABADI, Z. et al. How Can Organic Amendments Help to Bind Sulfadiazine in the Soil?—An Iranian Soil Study. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 50, n. 19, p. 2397-2410, 2019.

AHMADABADI, Z. et al. The effect of bio/organic fertilizers on the phytotoxicity of sulfadiazine to *Echium amoenum* in a calcareous soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111408, 2021.

AKHZARI, D.; PESSARAKLI, M.. Effect of drought stress on total Protein, essential oil content and physiological traits of *Levisticum Officinale* Koch. **J. Plant Nutr (justaccepted)**. v. 39, n. 10, p. 1365-1371, 2015.

ALCÂNTARA, F. A. Aspectos básicos sobre a produção local de fertilizantes alternativos para sistemas agroecológicos. **Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E)**, 36 p., 2016.

ALIREZA, K. et al. Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. p. 1-5, 2015.

ALVAREZ, C. et al. Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, n.1, v.110, p.93-101, 2012.

ATEIA, E. M.; OSMAN, Y. A. H.; MEAWAD, A. E. A. H. Effect of organic fertilization on yield and active constituents of *Thymus vulgaris* L. under North Sinai conditions. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**. v. 5, n. 4 p.555-565, 2009.

BADALINGAPPANAVAR, R. et al. Manejo de fertilizantes orgânicos no cultivo de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Jour. of Pharmacognosy and Phytochemistry**, p. 126-129, 2018.

BANKAR, S. M., et al. Comparative performance of coloured shade net house and open field condition on growth and yield of cluster bean varieties. **Journal of Agrometeorology**. V. 19, Special Issue, P.140-144, 2017.

BARANAUSKIENĖ, R., et al. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7751-7758, 2003.

- BASAK, B. B. et al. Organic nutrient management through manures, microbes and biodynamic preparation improves yield and quality of Kalmegh (*Andrographis paniculata*), and soil properties. **Journal of Plant Nutrition**, v. 43, n. 4, p. 548-562, 2019.
- BERGAMASCHI, H.; BERGONCI, J. I. **As plantas e o clima: princípios e aplicações**. Guaíba: Agrolivros, 2017. 352 p.
- BIBIANO, C. S. et al. Organic manure sources play fundamental roles in growth and qualitative production of essential oil from *Dysphania ambrosioides* L. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111512, 2019.
- BISTGANI, Z. E et al. Application of combined fertilizers improves biomass, essential oil yield, aroma profile, and antioxidant properties of *Thymus daenensis* Celak. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 434-440, 2018.
- BLUM, L. E. B. et al. Produção de moranga e pepino em solo com incorporação de cama aviária e casca de pinus. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 627-631, 2003.
- BONACINA, C. et al. Changes in growth, oxidative metabolism and essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) subjected to salt stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 12, p. 1665, 2017.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 61, de 8 de Julho de 2020. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, n. 134, 15 de Julho de 2020, seção 1. Pag. 5. <http://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-61-de8-de-julho-de-2020-266802148>.
- BUTHELEZI, M. N. D., et al. D Spectral quality of photo-selective nets improves phytochemicals and aroma volatiles in coriander leaves (*Coriandrum sativum* L.) after postharvest storage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 328-334, 2016.
- CAMPOS, E. V., et al. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicators**, v. 105, p. 483-495, 2019.
- CHANG, X.; ALDERSON, P. G.; WRIGHT, C. J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1-3, p. 216-223, 2008.
- CORRÊA, R. M. et al. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.
- COSTA, A. G et al. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã pimenta cultivada sob malhas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, n.4, p.534-540, 2012.
- COSTA, B. N., et al. A. Anatomical modifications of *Butia capitata* propagated under colored shade nets. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3615-3624, 2018.
- COSTA, P., et al. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three Lamiaceae species. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 341-346, 2015.
- CROCOLL, C. et al. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. **Plant molecular biology**, v. 73, n. 6, p. 587-603, 2010.

CROCOLL, C. **Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme.** Academic Dissertation, der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2011.

DAFF (Department of Agriculture, Forestry & Fisheries). Production guidelines for thyme: Thyme production. **Directorate Communication Services: Plant Production.** Pretoria, South Africa, 25 p., 2012.

DAUQAN, E. M. A.; ABDULLAH, A. Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. **Journal of Applied Biology & Biotechnology.** v. 5, n.2, p. 017-022, 2017.

DEMARTELAERE, A. C. F. et al. Qualidade fisiológica de *Daucus carota* L. utilizando diferentes adubações orgânicas/ Physiological quality *Daucus carota* L. using differents organics fertilizers. **Brazilian Journal of Development,** v. 6, n. 11, p. 90260-90276, 2020.

DÍAZ-PÉREZ, J. C.; JOHN, K. St. B. Pepper (*Capsicum annum* L.) under Colored Shade Nets: Plant Growth and Physiological Responses. **HortScience,** v. 54, n. 10, p. 1795-1801, 2019.

DÍAZ-PÉREZ, J. C. et al. Bell Pepper (*Capsicum annum* L.) under Colored Shade Nets: Fruit Yield, Postharvest Transpiration, Color, and Chemical Composition. **HortScience,** v. 1, n. aop, p. 1-7, 2020.

DZIDA, K. et al. Effect of natural fertilization and calcium carbonate on yielding and biological value of thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus,** v. 18, n. 5, 2019.

EKO, S. N., et al. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effect of spices (*Thymus vulgaris*, *Murraya koenigii*, *Ocimum gratissimum* and *Piper guineense*) in alloxan-induced diabetic rats. **International Journal of Biosciences,** v. 4, n. 2, p. 179-87, 2014.

ESPINDOLA-JUNIOR, A. et al. Variação na estrutura foliar de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Botânica,** n.4, v.32, p.749-758, 2009.

FLAISHMAN, M. A. et al. Differential response of cell-cycle and cell-expansion regulators to heat stress in apple (*Malus domestica*) fruitlets. **Plant Science,** v. 233, 82-94, 2015.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and Phenolic Acids: Role and Biochemical Activity in Plants and Human. **Journal of Medicinal Plants Research,** n.5, v.31, p. 6697-6703, 2011.

GOVAHI, M. et al. Comparing different soil fertility systems in Sage (*Salvia officinalis*) under water deficiency. **Industrial Crops and Products,** v. 74, p. 20-27, 2015.

GRIGORE, A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. **Romanian Biotechnological Letters,** University of Bucharest. v. 15, n. 4, p. 5436- 5443, 2010.

GUILLEN, M. D.; MANZANOS, M. J. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. **Food Chemistry,** v. 63, n. 3, p. 373-383, 1998.

GUPTA, C.; PRAKASH, D. Phytonutrients as therapeutic agents. **Journal of Complementary and Integrative Medicine,** v. 11, n. 3, p. 151-169, 2014.

HAFIZAH, Q.; HANUM, H.; DAMANIK, M. M B. Providing azolla and goat manure to increase nutrient N and growth of lowland rice (*Oryza sativa* L.). **Jurnal Pertanian Tropik,** v. 7, n. 1, p. 40-46, 2020.

- HENDAWY, S. F. et al. Productivity and oil quality of *Thymus vulgaris* L. under organic fertilization conditions. **Ozean Journal of Applied Sciences** v. 3, p. 203-216, 2010.
- HIGASHIKAWA, F. S.; SILVA, C. A.; BETTIOL, W. Chemical and physical properties of organic residues. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Campinas, v. 34, n. 5, p. 1743-1752, 2010.
- HUDAIB, M. et al. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. v. 29, n. 4, p. 691-700, 2002.
- ILIĆ, S. Z., et al. Light modification by color nets improve quality of lettuce from summer production. **Scientia Horticulturae**, v. 226, p. 389-397, 2017.
- ILIĆ, Z. S.; FALLIK, E. Light quality manipulation improves vegetable quality at harvest and postharvest: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 139, p. 79-90, 2017.
- JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Defesa: Curitiba, 2008.
- KARIMI, E. et al. Light intensity effects on production and antioxidant activity of flavonoids and phenolic compounds in leaves, stems and roots of three varieties of *Labisia pumila* Benth. **Australian Journal of Crop Science**, n.7, v.7, p.1016-1023, 2013.
- KAZIMIERCZAK, R. et al. Antioxidants content in chosen spice plants from organic and conventional cultivation **Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering**, v. 55, p. 164-170, 2010.
- KAZIMIERCZAK, R. et al. Bioactive substances content in selected species of medical plants from organic and conventional production. **Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering**, v. 56, n. 3, p. 200-205, 2011.
- KAZIMIERCZAK, R.; HALLMANN, E.; REMBIAŁKOWSKA, E. Effects of organic and conventional production systems on the content of bioactive substances in four species of medicinal plants. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 31, n. 2, p. 118-127, 2014.
- KERAMAT, M.; GOLMAKANI, M. T. Effect of *Thymus vulgaris* and *Bunium persicum* essential oils on the oxidative stability of virgin olive oil. **Grasas y Aceites**, v. 67, n. 4, 162-170, 2016.
- KHOSHSOKHAN, F., et al. Analysis of the essential oils of *Thymus kotschyanus* L. (10 populations) from Iran. **Cercetari Agronomice in Moldova**, v. 47, n. 2, p. 49-59, 2014.
- KOSAKOWSKA, O., et al. Morphological and Chemical Traits as Quality Determinants of Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.), on the Example of 'Standard Winter' Cultivar. **Agronomy**, v. 10, n. 6, p. 909, 2020.
- KOTILAINEN, T.; ROBSON, T. M.; HERNÁNDEZ, R. Light quality characterization under climate screens and shade nets for controlled-environment agriculture. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0199628, 2018.
- KUETE, V. *Thymus vulgaris*. In KUETE, V.; KARAOSMANOĞLU, O.; & SIVAS, H. (org.) **Medicinal Spices and Vegetables From Africa**. London: Academic Press-Elsevier, 2017. p. 599-610.

- LIMA, A. S. et al. Genomic characterization, molecular cloning and expression analysis of two terpene synthases from *Thymus caespititius* (Lamiaceae). **Planta**, v. 238, n. 1, p. 191-204, 2013.
- LLORENS, L. et al. Geographical and environment-related variations of essential oils in isolated populations of *Thymus richardii* Pers. in the Mediterranean basin. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 246-254, 2014.
- MACEDO, A. F. et al. The effect of light quality on leaf production and development of in vitro-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, n.1, v.70, p.43-50, 2011.
- MAHDAVI, A.; MORADI, P.; MASTINU, A. Variation in Terpene Profiles of *Thymus vulgaris* in Water Deficit Stress Response. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1091, 2020.
- MAIK, K. et al. Moderate drought and signal transducer induced biosynthesis of relevant primary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*), greater celandin (*Chelidonium majus*) and parsley (*Petroselinum crispum*). **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 158-166, 2015.
- MAJDI, M. et al. Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with thymol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 152-162, 2017.
- MALIK, R. Cultivation of medicinal and aromatic crops as a means of diversification of agriculture in India. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2014.
- MARGENAT, A. et al. Occurrence and human health risk assessment of antibiotics and trace elements in *Lactuca sativa* amended with different organic fertilizers. **Environmental Research**, v. 190, p. 109946, 2020.
- MARIN, F. R. et al. Intensificação sustentável da agricultura brasileira: cenários para 2050. **Revista de Política Agrícola** v. 25, p. 108-124, 2016.
- MASTILOVIĆ, J. et al. Influence of light modification on postharvest butter lettuce quality: differences between external and internal leaves. **Zemdirbyste-Agriculture**, v. 106, n. 1, 2019.
- MELO, A. A. M.; ALVARENGA, A. A. Sombreamento de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 'Pacifica White' por malhas coloridas: Desenvolvimento Vegetativo. **Ciência e Agrotecnologia**, n.2, v.33, p. 514-520, 2009.
- MELO, L. C. A.; SILVA, C. A.; DIAS, B. O. Caracterização da matriz orgânica de resíduos de origens diversificadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 101-110, 2008.
- MILENKOVIĆ, L., et al. New technology in basil production with high essential oil yield and quality. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111718, 2019.
- MOHAMED, A.; MOHAMED, A.; OMAR, A. A. A study to find thyme oil dose that kill 50% of mice and minimal dose that kill all mice and maximum nonlethal Dose. **Nature and Science**. v. 11, n. 12, p. 52-53, 2013.
- MÖLLER, K. Status de fertilidade do solo e fluxos de entrada e saída de nutrientes de sistemas especializados de cultivo orgânico: uma revisão. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 112, n. 2, p. 147-164, 2018.
- NABAVI, S. M. et al. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. **Food Chemistry Journal**, v. 173, p. 339–347, 2015.

- NANASOMBAT, S.; THONGLONG, J.; JITLAKHA, J. Formulation and characterization of novel functional beverages with antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities. **Functional Foods in Health and Disease**. v. 5, n.1, p. 1-16, 2015.
- NASCIMENTO, L. B. S. et al. Increased Antioxidant Activity and Changes in Phenolic Profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) *Persoon* (Crassulaceae) Specimens Grown under Supplemental Blue Light. **Photochemistry and Photobiology**, v.89, p.391–399, 2013.
- NIEMI, K. et al. Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scot pine in vitro. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, n. 1, p. 123-128, Jan. 2005.
- NIKOLIĆ, M. et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 52, p. 183-190, 2014.
- NOROOZISHARAF, A.; KAVIANI, M. Effect of soil application of humic acid on nutrients uptake, essential oil and chemical compositions of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.) under greenhouse conditions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 3, p. 423-431, 2018.
- NOVAIS, R. F.; et al. (Ed.) **Fertilidade do Solo**. Viçosa: SBCS, 2007.
- OLIVEIRA, V. C. et al. Respostas fisiológicas de plantas de orégano (*Origanum vulgare* L.) cultivadas sob malhas coloridas e fertilizantes orgânicos. **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, v. 11, n. 2, p. 400-407, 2017.
- OMBODI, A. et al. Effects of external coloured shade nets on sweet peppers cultivated in walk-in plastic tunnels. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 43, n. 2, p. 398-403, 2015.
- PENTEADO, S. R. **Agricultura orgânica**. Piracicaba: ESALQ-Divisão de Biblioteca e Documentação, 2001.
- PES, L. Z.; ARENHARDT, M. H. **Fisiologia vegetal**. Santa Maria-RS: Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Politécnico, Rede e-Tec Brasil, 2015, p. 81.
- PINTO, D. F. P. **Composto bokashi com inóculo nativo e comercial, farinha de penas e a disponibilidade de nitrogênio e fósforo**. Master's Dissertation. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2018.
- PINTO, L. P. et al. Levantamento de dados sobre os dejetos suínos e suas características. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 3, n. 3, p. 179-187, 2014.
- PORTE, A.; GODOY, R. Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. essential oil from Rio de Janeiro State (Brazil). **Journal of Serbian Chemical Society**. v. 73, p. 307-310, 2008
- POURHOSSEINI, S. H., et al. Diversity of phytochemical components and biological activities in *Zataria multiflora* Boiss. (Lamiaceae) populations. **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 148-157, 2020.
- PRASANTH, R. et al. Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. **Medicinal & Aromatic Plants**. v. 3, n. 4, p. 1-3, 2014.
- REDDY, P., et al. Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 3, p. 164-166, 2014.

- REY, C.; SÁEZ, F. Field culture, in vitro culture and selection of *Thymus*. Thyme, the Genus *Thymus*. **London: Taylor & Francis**, p. 177-196, 2002.
- RIBEIRO, A. S., et al. Colored shade nets induced changes in growth, anatomy and essential oil of *Pogostemon cablin*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1823-1835, 2018.
- ROBY, M. H. H. et al. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**. v. 43, p. 827-831, 2013.
- RUDOLPH, Kristin et al. Expression, crystallization and structure elucidation of  $\gamma$ -terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 72, n. 1, p. 16-23, 2016.
- RUSSO, M.; HONERMEIER, B. Effect of shading on leaf yield, plant parameters, and essential oil content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Journal of applied research on medicinal and aromatic plants**, v. 7, p. 27-34, 2017.
- SALEH, H. et al. The Application of *Thymus vulgaris* in traditional and modern medicine: A Review. **Global Journal of Pharmacology**. v. 9, n. 3, p. 260-266, 2015.
- SANTOS, F. M. dos. **Adubação orgânica, agro-homeopatia e cultivo in vitro no crescimento e a produção de constituintes voláteis de *Aloysia gratissima***. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 132 p., 2012.
- SATYAL, P. et al. Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. **Foods**, v. 5, n. 4, p. 70, 2016.
- SHAHAK, Y.; et al. Colornets: crop protection and light-quality manipulation in one technology. **Acta Horticulturae**, v.659, p.143-161, 2004.
- SHAJI, H.; CHANDRAN, V.; MATHEW, L. Organic fertilizers as a route to controlled release of nutrients. In: **Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture**. Academic Press, 2020. p. 231-245.
- SHARAF, EL-DIN et al. The Effect of Organic and Bio-Fertilization on Vegetative Growth and Yield of Thyme (*Thymus vulgaris*, L.). **Journal of Plant Production**, v. 10, n. 12, p. 1175-1185, 2019.
- SHARAFZADEH, S.; ZARE, M. Effect of drought stress on qualitative and quantitative characteristics of some medicinal plants from Lamiaceae family. **Advances in Environmental Biology**. v. 5, n. 8, p. 2058–2062, 2011.
- SHARANGI, A. B.; GUHA, S. Wonders of leafy spices: Medicinal properties ensuring Human Health. **Science International**. v. 10, p. 312-317, 2013.
- SILVA, M. G. C. M.; DEL VALLE, T. A. **Produção de caprinos** – Lavras: Ed. UFLA, 2018. 109 p.
- SIVAKUMAR, D.; JIFON, J.; SOUNDY, P. Spectral quality of photo-selective shade nettings improves antioxidants and overall quality in selected fresh produce after postharvest storage. **Food reviews international**, v. 34, n.3, 290-307, 2018.
- SKUBIJ, N.; DZIDA, K. Effect of natural fertilization and the type of substrate on the biological value of the thyme herb (*Thymus vulgaris* L.). **Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus**, v. 15, n. 6, p. 291-304, 2016.

- SOUZA, C. S. et al. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi after organic fertilization in maize, cowpea and cotton intercropping systems. **Acta Scientiarum. Agronomy**. [S. l.]. vol.34, n.2, pp. 149-156, 2012,
- STAHL-BISKUP, E.; SAEZ, F. Thyme: the genus *Thymus* (Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles). **Journal of Essential Oil Research**. v. 330, p. 415-848, 2002.
- STAHL-BISKUP, E.; VENSKUTONIS, R. P. *Thyme*. In: Peter, K.V. (Ed.), **Handbook of Herbs and Spices**. 2 ed. Abington, Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2012. p. 499–525.
- TAIZ, L. et al., **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 888p. 2017.
- TEIXIDO, M. et al. Speciation of the ionizable antibiotic sulfamethazine on black carbon (biochar). **Environmental science & technology**, v. 45, n. 23, p. 10020-10027, 2011.
- THOMPSON, J. D. et al. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. **Journal of chemical ecology**, v. 29, n. 4, p. 859-880, 2003.
- TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; TRINDADE, H. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 89-99, 2019.
- TRANI, P. E. et al. **Adubação orgânica de hortaliças e frutíferas**. Campinas: IAC, 2013.
- TRANI, P. E. et al. **Superfosfato simples com esterco animal: um bom fertilizante organomineral**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_2/organomineral/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_2/organomineral/index.htm)>. Acesso em: 17/11/2020.
- VENSKUTONIS, P. R.; POLL, L.; LARSEN, M. Influence of drying and irradiation on the composition of volatile compounds of thyme (*Thymus vulgaris* L). **Flavour and Fragrance Journal**, [S.l.]. v. 11, p. 123-128, 1996.
- WESOLOWSKA, A.; JADCZAK, D. Comparison of the chemical composition of essential oils isolated from two thyme (*Thymus vulgaris* L.) cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 47, n. 3, p. 829-835, 2019.
- ZANDVAKILI, O. R. et al. The potential of green manure mixtures to provide nutrients to a subsequent lettuce crop. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 48, n. 19, p. 2246-2255, 2017.
- ZHU, Y. et al. The effects of climate on decomposition of cattle, sheep and goat manure in Kenyan tropical pastures. **Plant and Soil**, v. 451, p.325 – 343, 2020.
- ZRIG, A. et al. Essential oils, amino acids and polyphenols changes in salt-stressed *Thymus vulgaris* exposed to open-field and shade enclosure. **Industrial Crops and Products**, v. 91, p. 223-230, 2016.



## SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

### **Artigo 1 – Colored shade nets and different harvest times alter the growth, antioxidant status, and quantitative attributes of glandular trichomes and essential oil of *Thymus vulgaris* L.<sup>1</sup>**

#### **Malhas coloridas e tempo de colheita alteram o crescimento, o status antioxidante e os atributos quantitativos nos tricomas glandulares e no óleo essencial de *Thymus vulgaris* L.**

#### **Abstract**

Its popularity in Mediterranean cuisine and gastronomy in general, as well as its medicinal and aromatic value, contributes to the high demand for *Thymus vulgaris* (thyme). Light is the source of energy, a signaling agent for growth, and a modulator of physiological responses in plants. The objective of this study was to evaluate the effects of cultivating thyme in tropical conditions under differently colored shade nets on vegetative growth, photosynthetic pigments, antioxidant activity, and quantitative and qualitative characteristics of its essential oil (EO) in two seasons. The treatments were cultivation in full sun and under blue, black, and red nets in tropical conditions in the fall and spring seasons. The plants were harvested 100 days after transplanting. Leaf, stem, root, and total dry weight were evaluated; photosynthetic pigments and nonenzymatic antioxidant activities were quantified; and parameters related to the production of EO were determined. With the exception of chlorophyll *a*, carotenoids, and some EO chemical compounds, the cultivation of thyme in the spring brought significant gains to the plants regardless of the light conditions. The cultivation of thyme under full sun produced an increase of up to 82.2% in dry weight and 639% in EO yield compared to cultivation under nets. It also supported the highest antioxidant activity, regardless of the growing season. On the other hand, cultivation under full sun provided the lowest chlorophyll *a* and *b* and thymol contents. Thus, cultivation in the warmer seasons and under full-sun conditions are the best options for cultivating *T. vulgaris* in a region with a tropical temperate rainy climate (mesothermal).

**Keywords:** Light manipulation; cultivation strategies; thyme; thymol.

---

<sup>1</sup> Versão preliminar para a revista **Industrial Crops and Products**

## 1 Introduction

*Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) is an aromatic herb of great commercial interest. Its applicability is due largely to its essential oil, which is highly demanded by the pharmaceutical, cosmetic, and food industries. Its popularity in Mediterranean cuisine and in gastronomy in general also contributes to the commercial interest in this species, and it has other uses (Marín-Valencia et al., 2020; Dauqan & Abdullah, 2017). Its medicinal interest arises from its wide range of biological activities, such as antioxidant, carminative, expectorant, anti-spasmodic, antimicrobial, antifungal, antiviral, antiprotozoal, pesticidal, and antibacterial activities (Nikolic et al., 2014; Keramat et al., 2016, Dauqan & Abdullah 2017).

*T. vulgaris* is a perennial shrub native to the Mediterranean region that has chemical polymorphisms in its natural populations, which determine its biological and pharmacological properties (Dauqan & Abdullah 2017). In Mediterranean habitats, six basic chemotypes have been described according to the main component of their essential oil: thymol, carvacrol, linalool, geraniol,  $\alpha$ -terpineol, and thuyanol-4, of which the thymol chemotype is the most widely used in industries and as a seasoning (György et al., 2020).

Brazilian agribusiness has been a driver of the country's economy. According to data from the Quarterly National Accounts of the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), the nominal GDP growth of Brazilian agriculture between the first semester of 2019 and the first semester of 2020 was 34.5% (CEPEA, 2020). Brazilian soil–climate conditions favor the expansion and diversification of the agro-industrial product portfolio. However, because it is a country of continental dimensions, it has a wide diversity of climatic elements, whose factors influence plant growth and development. The total and secondary metabolite yields of several crops are influenced by genetic, phenological, and environmental factors and by agricultural management techniques (Mortensen, 2014; Oliveira et al., 2016; Russo & Honermeier 2017).

Among the various climatic elements, light, in addition to being an energy source, has a strong effect on growth signaling and on the modulation of physiological and metabolic responses in plants (Roeber et al., 2020). Photosensitive nets or UV-blocking films have been applied to improve vegetative production and manipulate secondary metabolism in plants (Costa et al., 2012; Chagas et al., 2013; Ilić & Fallik, 2017; Ribeiro et al., 2018). These agricultural technologies were developed not only to protect plants against excessive temperatures, high solar radiation, hail, wind, birds, and pests but also to improve the productive performance of crops (Buthelezi et al., 2016; & Fallik, 2017; Milenković et al., 2019).

Although shade nets are already used to maintain favorable growth microclimates, there is limited information on the influence of spectral quality of light from the photosensitive nets on the secondary metabolism of plants (Buthelezi et al., 2016; Kotilainen et al., 2018; Díaz - Pérez & John, 2019). Colored shade nets affect the quality and intensity of the light because each type of net (material or color) and its density are designed to modify the light transmission (Ilić et al., 2017; Milenković et al., 2019). Colored shade nets have positive effects on the levels of total phenols, flavonoids, ascorbic acid, and antioxidant capacity, such as in lettuce leaves (Ilić et al., 2017; Sivakumar et al., 2018), sweet pepper, tomato (Sivakumar et al., 2018; Díaz-Pérez & John, 2019; Díaz-Pérez et al., 2020), and seasoning herbs such as oregano, marjoram, and coriander (Buthelezi et al., 2016; Sivakumar et al., 2018; Stagnari et al., 2018). However, such responses are species dependent, as observed for *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae), in which spectral manipulation of light did not increase leaf yield or essential oil content (Oliveira et al., 2016; Russo & Honermeier 2017). In *T. vulgaris*, Zrig et al. (2016) showed that plants grown under a black net at 28% shading showed no changes in the levels of essential oils, amino acids, or polyphenols.

No study has evaluated the influence of the cultivation of *T. vulgaris* under different colored shade nets. Thus, due to the agroindustrial potential of *T. vulgaris* and the possible interference with this potential of certain cultivation practices in tropical climates, we aimed to evaluate the impact on the growth and the physiological and metabolic responses of its cultivation under colored shade nets and in two seasons.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Analysis of plant growth

The experiment was conducted in an area with full sun in the experimental field of the Medicinal Plants Garden of the Federal University of Lavras (UFLA), located at the geographical coordinates 21°14' S and 45°00' W at 918 m altitude. According to the Köppen-Geiger classification (1961), the predominant climate of the geographic region of the cultivation area is a montane tropical climate, Cwa, characterized as humid with dry winters and hot summers. The autumn and winter seasons in this region are characterized by a predominance of shorter days, greater thermal amplitude, with a reduction in daytime and nighttime temperatures. In the spring and summer, the predominant characteristics are increased days, lower end range, and increased day and night temperatures.

The experiment was conducted in a completely randomized design in a 4×2 factorial arrangement (three nets: blue, red, and black; and full sun × two seasons: fall 03/22 to 06/30/2018 and spring 09/08 to 12/16/2018), totaling eight treatments, with five replicates and ten plants per replicate, totaling 400 plants. Two plants were used per pot.

The exsiccate has been deposited in the herbarium of the Agricultural Research Company of Minas Gerais (EPAMIG) under number 58576. The thyme explants used were obtained by cutting ( $\pm 5$  cm) mother plants. They were placed in 128-cell styrofoam trays with the commercial substrate Tropstrato H™ and kept in an incubator with automatic irrigation. The explants were transplanted into 10-dm<sup>3</sup> pots when they were at least 10 cm tall (45 days).

The substrate used was a mixture of soil and coarse sand at a ratio of 2:1. The soil used in the substrate was collected from the 0-20 cm deep layer of a dystroferric red Latosol (EMBRAPA, 1997) in the municipality of Lavras, Minas Gerais, Brazil. The chemical characteristics of the substrate were as follows: base saturation (V%) = 21.35; organic matter (dag kg<sup>-1</sup>) = 1.03; pH in water = 5.4; P-Rem (mg L<sup>-1</sup>) = 15.22; K (mg dm<sup>-3</sup>) = 25.89; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, H+Al (cmolc dm<sup>-3</sup>) = 0.68, 0.05, 0.07, 2.93; Zn, Fe, Mn, Cu, B, and S (mg dm<sup>-3</sup>) = 0.46, 43.3, 15.34, 1.38, 0.02, and 1.6, respectively.

The irrigation in this experiment followed a 48-hour irrigation schedule, where the water volume applied was based on the pot weight to raise the substrate moisture to field capacity (FC) and keep it between 70 and 90%. Each net was held up with a 3-m-long × 3-m-wide × 2-m-tall wooden frame. The experimental conditions of the treatments are described in Table 1.

After 100 days of transplanting the explants, the following parameters were evaluated: leaf dry weight (LDW), stem dry weight (SDW), root dry weight (RDW), and total dry weight (TDW); chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll, carotenoid, and phenolic contents; diameter and density of glandular trichomes; content, yield, and chemical composition of the essential oil; and quantitative determinations of total antioxidant capacity (TAC), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), and DPPH free radical scavenging.

## 2.2 Oxidative stress

The oxidative stress in *T. vulgaris* was determined by calculating the following spectrophotometrically: TAC by the formation of the green phosphomolybdenum complex (PRIETO et al., 1999); ORAC with fluorescein, as described by CAO et al. (1993); DPPH free radical scavenging activity (SOLER-RIVAS et al., 2000); and total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method (SINGLETON et al., 1999). The plant extracts (50 mg of dry leaves/mL) were prepared by sonication at 50 Hz (2×15 min) in 50% hydroethanolic solution. The samples

were centrifuged (6000 rpm×10 min), and the supernatants were pooled and frozen at -4 °C until analysis. The result of the TAC assay is expressed in milligrams of ascorbic acid equivalent per gram of dry leaf (mg AAE g<sup>-1</sup>). The ORAC values were calculated using the regression equation between the Trolox concentration and the net area under the curve (AUC), according to CAO et al. (1993), and expressed in moles of Trolox per gram of dry leaf. The results of the DPPH free radical scavenging assay are expressed in antioxidant activity index (AAI), as proposed by Scherer and Godoy (2009), where the plant extract is classified as having weak antioxidant activity (AAI ≤ 0.5), moderate antioxidant activity (0.5 ≤ AAI ≤ 1.0), strong antioxidant activity (1.0 ≤ AAI ≤ 2.0), or very strong antioxidant activity (AAI ≥ 2.0). The total polyphenol content is expressed in milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per gram of leaf dry weight (mg GAE g<sup>-1</sup>).

### 2.3 Measurement of photosynthetic pigments

The extraction and measurement of photosynthetic pigments followed the method developed by Hiscox and Israelstam (1979) with adaptations proposed by Barnes et al. (1992). In short, fresh leaves (50 mg) were weighed directly in Falcon tubes covered with aluminum foil, added to 10 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) saturated with calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>), and incubated at 65 °C for 48 hours. The samples were prepared in quadruplicate. DMSO saturation followed the protocol of Santos et al. (2008) with modifications. For this, DMSO was saturated with calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) at a ratio of 5 g L<sup>-1</sup> DMSO under constant stirring for 4 hours and then filtered twice under vacuum on double filter paper. The resulting solution was centrifuged at 6000 rpm for 10 minutes.

Next, three 3-mL aliquots of each replicate were transferred to a quartz cuvette, and the optical density values at 480, 649, and 665 nm were read in a TECAN INFINITY M200 PRO spectrophotometer operated with the I-Control<sup>®</sup> data processing system (version 3.37), against a CaCO<sub>3</sub>-saturated DMSO blank. The specific optical density value of each sample was calculated as the average of the readings of the three aliquots. The wavelengths and the equations used for the calculations were based on the method of Wellburn (1994), where:

$$\text{Chlorophyll } a_{649} = (12.47 \times A_{665}) - (3.62 \times A_{649});$$

$$\text{Chlorophyll } b_{665} = (25.06 \times A_{649}) - (6.5 \times A_{665});$$

$$\text{Carotenoids}_{480} = (1000 \times A_{480} - 1.29 \times C_a - 53.78 \times C_b)/220.$$

Total chlorophyll (*a* + *b*) was calculated by summing the results of the equations for chlorophyll *a* and *b*. All results are expressed in mg g<sup>-1</sup> fresh matter.

## 2.4 Distillation and chemical analysis of essential oil

The essential oil was distilled in a Clevenger apparatus modified according to SILVA et al. (2018), with minor modifications. In short, 10 g of dry leaves was hydrodistilled in 1000 mL of distilled water for 90 minutes. The essential oil was separated from the hydrolate by liquid–liquid partitioning with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3×5 mL) and then dehydrated with 5 g Epsom salt ( $\text{MgSO}_4$ ). The essential oil was weighed and stored under refrigeration at 4 °C in amber vials until analysis. The essential oil content (%) represents the weight of the oil in milligrams per 100 mg of leaf dry weight, and the essential oil yield is expressed in milligrams per plant.

The chemical analyses by gas chromatography were performed according to BIBIANO et al. (2019), with minor modifications. The modifications made were in the injector and detector temperatures, which were set to 220 °C and 250 °C, respectively; in the split ratio, which was 50:1; and in the oven conditions, where the initial temperature was held at 60 °C in isothermal conditions for 1.5 minutes, followed by a temperature ramp of 3 °C  $\text{min}^{-1}$  to 100 °C, then a temperature ramp of 4 °C  $\text{min}^{-1}$  to 200 °C, and finally a temperature ramp of 10 °C  $\text{min}^{-1}$  to 240 °C. The other conditions and the analysis of the results were exactly the same as those reported by BIBIANO et al. (2019), including the analyte concentrations, which are expressed as the mean percentage of the normalized relative area for the chromatographic peaks  $\pm$  the standard deviation. The analyses were performed in triplicate ( $n = 3$ ).

## 2.5 Analysis of trichomes

To analyze the glandular trichomes, 12 leaves were collected from the fourth and fifth nodes of the fully expanded apical bud. The leaves were fixed in modified Karnovsky's solution (2.5% glutaraldehyde, 2.5% formaldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, 20.001 M CaCl) and then kept in this solution in a refrigerator until the following steps. Next, the leaves were washed three times in sodium cacodylate buffer, postfixed in 1% osmium tetroxide for two hours, and washed twice in distilled water for 15 minutes. In addition, the leaves were dehydrated in a graded acetone series (25%, 50%, 75%, 90%, and 100%) for 10 minutes (Alves et al. 2008). Finally, the samples were dried to the critical point (BAL-TEC, model CPD-030, Principality of Liechtenstein) and mounted for gold coating in a sputter coater (BAL-TEC, model SCD-050, Liechtenstein). All leaves were analyzed under a scanning electron microscope (LEO, model EVO 40 XVP, Cambridge, UK). The anatomical components observed in the cross-sections were the trichome diameter and density (presence and number of trichomes) of the abaxial and adaxial epidermis.

## 2.6 Statistical analysis

The data were first analyzed with the Hartley, Jarque-Bera (Jarque Bera, 1980), and generalized ESD tests (Rosner, 1983) to evaluate the conditions of homogeneity of variances, normality of the residuals, and presence of outliers, respectively. Among all variables, only RDW, chlorophyll *a* and *b*, DPPH, TAC and the diameter and density of trichomes did not meet the normality criteria, and it was necessary to transform the data into ordinal (rank) data. Then, the data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and the treatments were compared with each other by the Scott-Knott test at 5% probability. The statistical analyses were performed using the SISVAR 5.3 statistical software (Ferreira, 2011).

## 3 Results and discussion

### 3.1 Analysis of plant growth

The plants of *T. vulgaris* had significantly less vegetative growth when grown under nets. For all growth variables, cultivation under full sun showed better performance, regardless of the cultivation season. The lowest dry matter accumulation in all growth variables was observed in the cultivation under the blue shade net (Figure 1). The mean reduction provided by the shading of thyme plants when compared to full sun was 46.8, 53.6, and 82.2% for the red, black, and blue shade nets, respectively. The greater dry matter accumulation by plants grown under the red shade net than by plants grown under the blue shade net can be attributed to the fact that the red net stimulates the growth rate and vegetative vigor, while the blue net hinders the growth and development of the plant (Costa et al., 2012).

Spring was the season that provided the highest accumulation of all dry matter variables and under all shading conditions. The mean increases provided by spring were 80.1, 107.1, 427.75, and 154.45% for LDW, SDW, RDW, and TDW, respectively (Figure 1). This result suggests that the shading conditions to which the thyme crops were subjected were extremely harmful to the vegetative growth of this species.

The reduction in dry weight caused by shading observed in this study confirms the information in the technical guide for thyme production of the Department of Agriculture, Forestry & Fisheries (DAFF, 2012). According to this document, thyme does not tolerate shading and depends on the light spectrum, and these parameters are aggravating factors for yield losses. The lower dry matter accumulation under shade nets may be explained by the

decrease in signal generation for the regulation of developmental stages, decreased translocation of assimilates to various parts of the plant, and reduction of the palisade parenchyma and stomatal density of the leaves, resulting in lower CO<sub>2</sub> uptake under the low-light environment (Rezaei et al., 2019).

The lower dry matter accumulation under the blue shade net indicates a relationship between dry matter and the light spectrum. The blue net provides a transmittance peak in the blue-green region (400-540 nm) and consequently reduces the passage of ultraviolet light and red, far-red, and yellow light, which have transmittance at wavelengths greater than 590 nm (Costa et al., 2012; Ilić & Fallik, 2017). The main direct effect of alteration blue light is the change in the activation of photoreceptors and the consequent alteration in the phototropism of plants. In this way, according to Ilić & Fallik (2017), blue nets can cause dwarfism. Other plants of the Lamiaceae family, such as *Ocimum basilicum* L. (Martínez-Gutiérrez et al., 2016) and *Melissa officinalis* (Oliveira et al., 2016), also show reduced dry weight under shading conditions, including under blue shade nets.

In the literature, there are few studies on plants of the genus *Thymus* grown under colored shade nets. Zrig et al. (2016) observed that *T. vulgaris* cultivated under a black shade net accumulated a higher leaf fresh and dry matter than those grown under open field conditions. The difference in the results of Zrig et al. (2016) from those of the present study may be due to significant differences in experimental conditions. Zrig et al. (2016) conducted their study under a black shade net and in an open field, combined or not with salt stress, and found that under salt stress, cultivation under a black shade net favors leaf mass accumulation.

On the other hand, the season was a determinant for the success of the cultivation of this species. The spring brought more favorable conditions to the thyme plants, such as higher radiation (between 834 - 2361  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) and higher temperatures (24.40 - 27.9 °C) (Table 1). In addition, spring is characterized by warmer temperatures and longer days, the opposite of fall. This characteristic of thyme plants may be related to their natural habitat. *T. vulgaris* originates from Mediterranean regions, where the arid and semiarid climate is predominant, with high radiation and temperature (Dauqan & Abdullah 2017). In addition, the lower light intensity observed with the shade nets and in the fall can directly restrict photosynthesis, which may indirectly affect the carbon gain for physiological acclimation responses (Laanisto & Niinemets, 2015). Other studies also observed that the shading promotes the decrease in daytime temperature, an increase in nighttime temperature, and an increase in soil moisture and air humidity in the fall, which may be favorable or unfavorable to the species under the specific cultivation conditions (Valladares et al., 2016).



### 3.2 Oxidative stress

Plants produce a series of metabolites for adaptation to stressful environments, such as high temperatures and excess of or fluctuations in light. This response is mediated by signaling during plant–environment interactions through the expression of genes related to biosynthesis and the accumulation of metabolic compounds that activate antioxidant defense mechanisms (Zhang et al., 2019; Roeber et al., 2020). Light plays an important role in the biosynthesis of many antioxidants, such as carotenoids, flavonoids, anthocyanins, and  $\alpha$ -tocopherol (Ilić et al., 2017). Plants under light stress, caused by excessive intensity or disproportionate spectral quality of light, are subject to an imbalance in redox homeostasis, leading to the production of reactive oxygen species (ROS) that are highly reactive and toxic because they cause damage to proteins, lipids, carbohydrates, and DNA (Asada, 2006; Gill & Tuteja, 2010).

The cultivation of *T. vulgaris* under shade nets or in full sun was significantly affected by the light environment and the season (Table 2). Thyme plants grown under full sun were shown to be under higher oxidative stress because they exhibited significantly higher antioxidant responses than the other groups, except in terms of ORAC in the fall. ROS are produced constantly in plant cells as a result of aerobic metabolism in most intracellular organelles, such as mitochondria, peroxisomes, and chloroplasts (You & Chan, 2015). However, there is a dynamic balance between ROS generation and the antioxidant defense system. According to Gill & Tuteja (2010), ROS will be harmful, protective, or have a signaling role depending on the balance between their production and elimination. Plant tolerance to stress can therefore be improved by increasing the antioxidant levels. This phenomenon probably occurred in thyme plants grown in full sun, which activated their antioxidant defense mechanism under light stress.

Greater antioxidant activity under full-sun conditions has been reported in many vegetables, including *Lactuca sativa* (Ilić et al., 2017), *Capsicum annum* (Díaz-Pérez et al., 2020), and *Ocimum basilicum* (Milenković et al., 2019). Most likely, the reason for the higher antioxidant activity under full-sun conditions is light stress (high light intensity), which provides increased radiation intensity (UV and photosynthetically active radiation) and temperature (Table 1). According to Ilić et al. (2017), high light intensity (1600 and 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) may predispose plants to photoinhibition, heat stress, and stomatal closure, leading to a stress response.

In the red shade net, the levels of total phenolic compounds were similar to those under full sun. This phenomenon indicates that red light plays an active role in the synthesis of phenolic compounds in thyme. However, the participation of light in the biosynthesis of phenolic compounds is specific to each species, as shown by Taulavuori et al. (2018) for three common culinary herbs - basil (*Ocimum basilicum* L.), arugula (*Eruca sativa* Mill.), and red-veined dock (*Rumex sanguineus* L.). In basil and arugula, blue light increased the contents of phenolic compounds, while supplementation with this light did not have an effect on red-veined dock. However, the blue and black shade nets generated the lowest levels of phenolic compounds and lowest antioxidant capacity in *T. vulgaris* in the conditions of the present study.

The season also influenced the antioxidant responses (Table 2). In the spring, with the exception of the ORAC assay, the plants grown under red shade net showed antioxidant responses significantly stronger than those in the fall. This may be associated with light stress as, on average, spring showed approximately 80% greater overall radiance than fall (Table 1). The differences observed in the quantitative responses of antioxidant capacity between the total phenolic compound, TAC, and DPHH assays and the ORAC assay are related to the mechanisms of action of these assays. The assay to measure total phenolic content used the Folin-Ciocalteu reagent, the TAC and DPPH assays are based on the electron transfer mechanism, while the ORAC assay is based on hydrogen atom transfer (Dudone et al., 2009). According to Dudone et al. (2009), unlike the other assays, ORAC takes into account the kinetics of the antioxidant action. These differences may explain the discrepancy between the results obtained with the ORAC assay and those obtained with the other assays.

To interpret the DPHH free radical scavenging ability, the scale of Sherer and Godoy (2009) was used. According to this scale, thyme was classified as having strong antioxidant activity ( $1.0 \leq \text{AAI} \leq 2.0$ ), as already established in the literature (Nikolic et al., 2014; Keramat et al., 2016, Dauqan & Abdullah 2017; György et al., 2020). However, the season of the year and shading influenced the degree of antioxidant activity of thyme, since in the fall in all treatments under shade nets, moderate antioxidant activity was observed ( $0.5 \leq \text{AAI} \leq 1.0$ ).

### 3.3 Photosynthetic pigments

Differences in the content and composition of photosynthetic pigments can be expected in plants grown under colored shade nets, since changes in spectral light promote different morphogenetic and photosynthetic responses (Ilić et al., 2017). In general, the concentrations of chlorophyll and carotenoids were affected by the light conditions (Table 3). The chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total chlorophyll contents were significantly lower in the full-sun crop in

each season. Chlorophyll *a* had higher expression in the fall, regardless of the shading conditions. Chlorophyll *b* content was much more affected than chlorophyll *a* by the light condition and season. Chlorophyll *b* and total chlorophyll were higher under the black shade net in both seasons and were much lower in crops under the blue shade net and full sun.

The levels of photosynthetic pigments are essential to estimate the photosynthetic potential of plants due to their direct relationship with the absorption and transfer of light energy, which means they influence the growth, development and adaptation of plants to biotic and abiotic conditions (Taiz et al., 2017). Ilić et al. (2017) and Díaz-Pérez and John (2019) reported that leaves from plants grown under colored shade nets typically have higher chlorophyll *a* and *b* contents than nonshaded leaves. This is probably because the plant uses the strategy of increasing the chlorophyll concentration in the leaves to capture diffuse radiation and produce the carbohydrates necessary for plant growth (Ilić & Fallik, 2017). *Melissa officinalis* and *Ocimum basilicum* cultivated under red, black, or blue shade nets also showed higher chlorophyll concentrations than plants grown under full sun (Oliveira et al, 2016; Russian; Honermeier, 2017; Milenković et al, 2019).

The mesh groups showed no significant differences in carotenoid content in either season, except for the red shade net treatment which was the smallest. The carotenoid levels were higher in the fall than the spring. One of the main functions of carotenoids is to protect chlorophyll molecules from photooxidation under excessive solar radiation (Díaz-Pérez & John, 2019). Our findings suggest that the main function of carotenoids in thyme plants was not protection from photooxidation, but rather it may be linked to the light absorption apparatus, which is also one of the functions of this pigment (Schiphorst & Bassi, 2020).

The observed variations between chlorophyll *b* and quasi-equal carotenoid contents suggest different light absorption strategies of thyme plants in different adverse situations. This is probably because the light absorbed by carotenoids and/or chlorophyll *b* in the light-harvesting complex (LHC) is quickly transferred to chlorophyll *a* and then to other antenna pigments closely associated with the reaction center (Schiphorst & Bassi, 2020). The LHC complex is involved in regulatory processes of the photosynthetic apparatus of the plant, so this inverse relationship can be a regulatory mechanism by which the plant absorbs more energy and compensates for its smaller photosynthetic area.

### 3.4 Essential oil and anatomical analysis

The secreting glandular trichomes in *T. vulgaris* leaves are responsible for the biosynthesis, secretion, and storage of its essential oil (Crocoll, 2011). Glandular trichomes play

a key role in the plant because they are specialized external secretory organs capable of producing, storing, and/or secreting several important natural compounds in different plant species (Majdi et al., 2017). In recent years, there has been growing interest in the glandular trichomes of several plants for better understanding the details and locations of the biosynthetic pathways of natural products (Majdi et al., 2017).

The diameter and density of the glandular trichomes were influenced by crop management (Figure 2a and b, Figure 3). Crops under the black shade net (Figure 2a, Figure 3c, e, and d) and crops under full sun (Figures 3g and h) had a larger trichrome diameter on the abaxial and adaxial surfaces, respectively.

The leaves of plants grown under black and red shade nets (Figure 2b) and under full sun (Figure 3d, f, e, and h) showed a higher density of glandular trichomes on the adaxial surface of the leaves. However, cultivation in full sun provided the largest diameters and density of these trichomes (Figure 2a and b). Similar results were reported by Majdi et al. (2017), who observed that the density of trichomes on the adaxial surfaces of *T. vulgaris* was approximately 2.5 times higher than that on the abaxial surfaces of the leaves.

In general, the content and yield of essential oil of *T. vulgaris* were also affected by the type of shade net and season (Figure 2c, e, and d). There was no difference in the essential oil content between the fall and spring crops, regardless of the light conditions. On the other hand, cultivation under full sun was significantly beneficial for increasing the EO content in both seasons. Cultivation under the blue shade net provided the lowest essential oil content in *T. vulgaris*. According to Oliveira et al. (2016), under shading conditions, changes in the incident light spectrum may provide wavelengths not absorbed by photosynthetic pigments, impairing the stimulation of terpene synthesis pathways and thereby interfering with the production of essential oil.

For essential oil yield, expressed in  $\text{mg plant}^{-1}$ , the difference between the factors was very evident in the thyme crop. Spring supported the highest essential oil yield of the thyme plants, which was 94.57% higher than in the fall. When analyzing the graph in Figure 2d, a decreasing trend of essential oil yield was observed in both seasons, starting with full sun and followed by red, black, and blue shade nets. This corresponded to an increase in full sun of 116.2, 163.1, and 639.5% over the red, black, and blue shade conditions, respectively. In the fall, the essential oil yield showed an increasing behavior from the blue net to the black net, while in the spring, only the black and red nets did not differ from each other (Figure 2d). The higher essential oil contents and yield under full-sun conditions corroborate the higher diameters and densities of glandular trichomes in thyme leaves (Figure 2). Figure 3 shows that

the glandular trichomes in plants grown under full sun had more turgid cells, possibly related to the higher concentration of essential oil in these structures.

The intensity and spectral quality of light has a significant impact on the essential oil content in other species of the family Lamiaceae. In the cultivation of *Melissa officinalis* L. under shade nets, Russo & Honermeier (2017) and Oliveira et al. (2016) observed a significant reduction in the essential oil content after 120 days of cultivation under black and red shade nets compared to full sun. Chagas et al. (2013) observed that the growth of *Mentha arvensis* and the essential oil content and yield were more affected by the intensity than by the spectral variation of the light imposed by red, black, and blue shade nets. In *Mentha piperita* L., Costa et al. (2012) observed worse production of essential oil when the plants were grown under a blue shade net. On the other hand, Ribeiro et al. (2018), studying *Pogostemon cablin* Benth., observed higher essential oil content under a blue shade net and higher yields under blue and red shade nets. Therefore, the responses to differences in light conditions are species specific and need specific studies to determine the ideal light management conditions.

Quantitative differences were observed in the levels of the chemical constituents of the essential oil of *T. vulgaris* according to the light conditions and harvest season. Chemical analysis of the essential oil of *T. vulgaris* leaves identified the presence of 20 to 21 chemical constituents that totaled 97.6 to 98.03% of the total chemical composition (Table 4). Among these compounds, those that represented more than 2% of the essential oil composition were 1-octen-3-ol,  $\rho$ -cymene,  $\gamma$ -terpinene, linalool, thymol, and carvacrol. This chemical composition of the essential oil of *T. vulgaris* is in agreement with other reports in the literature, such as Tohidia et al. (2019), Kosakowska et al. (2020), Paulus et al. (2020), and Sabah et al. (2020). The main constituents were thymol (58.83-68.16%),  $\rho$ -cymene (5.01-12.81%), and  $\gamma$ -terpinene (5.94-9.74%), which represented between 79.32-82.45% of the total chemical composition. Their concentrations differed by cultivation environment and season.  $\gamma$ -Terpinene and thymol were higher in the spring, and  $\rho$ -cymene was higher in the fall (Table 4).  $\rho$ -Cymene accumulated more in full sun,  $\gamma$ -terpinene under full sun and the red shade net, and thymol under the shade nets (Table 4).

Variations in essential oil compositions may be related to plant growth conditions, since secondary metabolites represent a chemical interface between a plants and its surrounding environment, and their synthesis is often affected by environmental conditions (Ribeiro et al., 2018). Under different amounts and qualities of light, the synthesis of secondary compounds in leaves can be altered by an altered participation of light photoreceptors, which is facilitated by a complex of photoreceptors and other pigments (Buthelezi et al., 2016; Pacheco et al., 2016).

In addition, light can affect the expression and activity of terpene synthases, which play an important role in the synthesis of terpenoids (Zhang et al., 2019). Majdi et al. (2017) reported increased gene expression of early pathway genes (*DXR*) and biosynthetic genes ( $\gamma$ -terpinene synthase, *TVTPSI*) when *T. vulgaris* plants were exposed to different biotic and abiotic stresses. Therefore, the higher levels of thymol in the leaves of *T. vulgaris* grown under shading conditions may have been due to increased gene expression of terpene synthases in response to stress conditions. Furthermore, even if the full-sun treatment provided a lower thymol concentration, the production of thymol in this treatment tended to be higher, since the essential oil yield was 116.2, 163.1, and 639.5% higher under full sun than under the red, black, and blue shade nets, respectively (Figure 2).

#### 4 Conclusions

The variation in solar radiation is a determinant factor for the cultivation of *T. vulgaris* in regions where a rainy temperate climate (mesothermal) predominates. Thyme plants in this edaphoclimatic conditions should preferably be grown in the spring season. Cultivation under colored shade nets in a mesothermal climate disfavors the growth and production of essential oil in *T. vulgaris*. However, a trend-increased concentrations of thymol are observed under shade nets. The cultivation of *T. vulgaris* under colored shade nets requires more research to define safer cultivation strategies because factors such as climatic conditions and the shading net itself directly affect thyme plants.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Universidade Federal de Lavras (UFLA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

#### References

Alves E., Leite B., Marucci R.C., Pascholati S.F., Lopes J.R.S., Andersen P.C.. 2008. Retention sites for *Xylella fastidiosa* in four sharpshooter vectors (Hemiptera: Cicadellidae) analyzed by scanning electron microscopy. *Curr Microbiol* 56: 531-538.

- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology*, 141(2), 391-396.
- Barnes, J. D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., & Davison, A. W. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 32(2), 85–100. doi:10.1016/0098-8472(92)90034-y
- Bibiano, C.S, Carvalho, A.A., Bertolucci, S.K.V., Torres, S.S., Corrêa, R.M., Pinto, J.E.B.P. Organic manure sources play fundamental roles in growth and quali-quantitative production of essential oil from *Dysphania ambrosioides* L. *Ind. Crops Prod.*, 139 (2019), p. 111512, 10.1016/j.indcrop.2019.111512
- Buthelezi, M. N. D., Soundy, P., Jifon, J., & Sivakumar, D. (2016). Spectral quality of photo-selective nets improves phytochemicals and aroma volatiles in coriander leaves (*Coriandrum sativum* L.) after postharvest storage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 161, 328-334.
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free radical biology and medicine*, 14(3), 303-311.
- CEPEA. CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. PIB do Agronegócio Brasileiro: PIB do Agronegócio Avança em Agosto. (2020). CEPEA/Esalq-USP e Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – CNA. 1-19.
- Chagas, J. H., Pinto, J. E. B., Bertolucci, S. K. V., Costa, A. G., de Jesus, H. C. R., & Alves, P. B. (2013). Produção, teor e composição química do óleo essencial de hortelã-japonesa cultivada sob malhas fotoconversoras. *Horticultura brasileira*, 31(2), 297-303.
- Costa, A. G., Chagas, J. H., Pinto, J. E. B. P., & Bertolucci, S. K. V. (2012). Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta cultivada sob malhas. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 47(4), 534-540.
- Crocoll, C. (2011). Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. Academic Dissertation, der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- DAFF (Department of Agriculture, Forestry & Fisheries). (2012) Production guidelines for thyme: Thyme production. Directorate Communication Services: Plant Production. Pretoria, South Africa, 25p.,.
- Dauqan, E. M., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.) herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(2), 17-22.

- Díaz-Pérez, J. C., & John, K. S. (2019). Bell Pepper (*Capsicum annum* L.) under Colored Shade Nets: Plant Growth and Physiological Responses. *HortScience*, 54(10), 1795-1801.
- Díaz-Pérez, J. C., John, K. S., Kabir, M. Y., Alvarado-Chávez, J. A., Cutino-Jiménez, A. M., Bautista, J., ... & Nambeesan, S. U. (2020). Bell Pepper (*Capsicum annum* L.) under Colored Shade Nets: Fruit Yield, Postharvest Transpiration, Color, and Chemical Composition. *HortScience*, 1(aop), 1-7.
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- György, Z., Incze, N., & Pluhár, Z. (2020). Differentiating *Thymus vulgaris* chemotypes with ISSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 92, 104118.
- Hiscox, J.D., And Israelstam, G.F. 1979. A method for the extraction of chloro- phyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57(12): 1332–1334. doi:10.1139/b79-163.
- Ilić, S. Z., Milenković, L., Dimitrijević, A., Stanojević, L., Cvetković, D., Kevrešan, Ž., ... & Mastilović, J. (2017). Light modification by color nets improve quality of lettuce from summer production. *Scientia Horticulturae*, 226, 389-397.
- Ilić, Z. S., & Fallik, E. (2017). Light quality manipulation improves vegetable quality at harvest and postharvest: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 139, 79-90.
- Jarque, C. M., & Bera, A. K. (1980). Efficient tests for normality, homoscedasticity and serial independence of regression residuals. *Economics letters*, 6(3), 255-259.
- Keramat, M., & Golmakani, M. T. (2016). Effect of *Thymus vulgaris* and *Bunium persicum* essential oils on the oxidative stability of virgin olive oil. *Grasas y aceites*, 67(4), 162.
- Koppen W.; Geiger, R. (eds). *Handbuck der Klimatologie*: Berlin, 1961.
- Kosakowska, O., Bączek, K., Przybył, J. L., Pawełczak, A., Rolewska, K., & Węglarz, Z. (2020). Morphological and Chemical Traits as Quality Determinants of Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.), on the Example of ‘Standard Winter’ Cultivar. *Agronomy*, 10(6), 909.



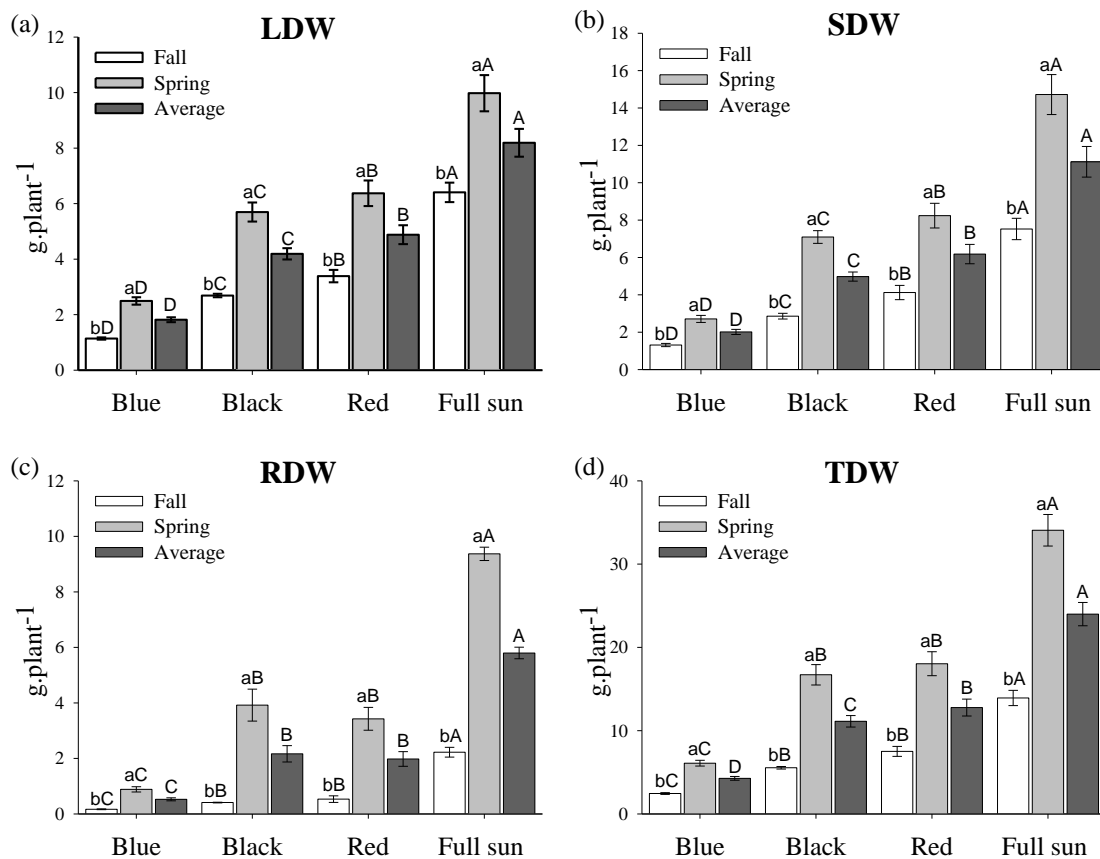
- Kotilainen, T., Robson, T. M., & Hernández, R. (2018). Light quality characterization under climate screens and shade nets for controlled-environment agriculture. *PloS one*, 13(6), e0199628.
- Laanisto, L., & Niinemets, Ü. (2015). Polytolerance to abiotic stresses: how universal is the shade–drought tolerance trade-off in woody species?. *Global Ecology and Biogeography*, 24(5), 571-580.
- Majdi, M., Malekzadeh-Mashhady, A., Maroufi, A., & Crocoll, C. (2017). Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with thymol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 152-162.
- Marín-Valencia, P. A., Carmona-Garcia, E., Poveda Giraldo, J. A., Arias Duque, N. P., Ballesteros, L. F., & Cardona Alzate, C. A. (2020). The integral use of aromatic plants: prefeasibility comparison of stand-alone and biorefinery processes using thyme (*Thymus vulgaris*) as base case. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11.
- Martínez-Gutiérrez, G. A., Nicolás-Santana, L., Ortiz-Hernández, Y. D., Morales, I., & Gutiérrez-Hernández, G. F. (2016). Growth and oil content of basil (*Ocimum basilicum* L.) grown under colored shade nets. *Interciencia*, 428-432.
- Milenković, L., Stanojević, J., Cvetković, D., Stanojević, L., Lalević, D., Šunić, L., ... & Ilić, Z. S. (2019). New technology in basil production with high essential oil yield and quality. *Industrial Crops and Products*, 140, 111718.
- Mortensen, L.M. (2014). The effect of air temperature on growth of eight herb species. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 1542-1546.
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., ... & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut and Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
- Oliveira, G. C., Vieira, W. L., Bertolli, S. C., & Pacheco, A. C. (2016). Photosynthetic behavior, growth and essential oil production of *Melissa officinalis* L. cultivated under colored shade nets. *Chilean journal of agricultural research*, 76(1), 123-128.
- Pacheco, F. V., de Paula Avelar, R., Alvarenga, I. C. A., Bertolucci, S. K. V., de Alvarenga, A. A., & Pinto, J. E. B. P. (2016). Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. *Industrial Crops and Products*, 85, 251-257.

- Paulus, D., Luchesi, L. A., Busso, C., Frata, M. T., & de Oliveira, P. J. B. (2020). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of Four Species of the Lamiaceae Family. *European Journal of Medicinal Plants*, 129-140.
- Prieto, P.; M. Pineda; M. Aguilar Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin e. *Analytical Biochemistry*, 269 (1999), pp. 337-341, 10.1006/abio.1999.4019
- Rezaei, M., Razmjoo, J., Ehtemam, M. H., Karimmojeni, H., & Zahedi, M. (2019). The interaction between shade and drought affects essential oil quantity and quality of *Vitex agnus-castus* L. leaves and seeds. *Industrial Crops and Products*, 137, 460-467.
- Ribeiro, A. S., Ribeiro, M. S., Bertolucci, S. K., Bittencourt, W. J., Carvalho, A. A., Tostes, W. N., ... & Pinto, J. E. (2018). Colored shade nets induced changes in growth, anatomy and essential oil of *Pogostemon cablin*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(2), 1823-1835.
- Rivas, C.S.; J.C. Espín; H.J. Wichers. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 11 (2000), pp. 330-338, 10.1002/1099-1565(200009/10)11:5<330::AID-PCA534>3.0.CO;2-G
- Roeber, V. M., Bajaj, I., Rohde, M., Schmülling, T., & Cortleven, A. (2020). Light acts as a stressor and influences abiotic and biotic stress responses in plants. *Plant, Cell & Environment*, 1-20, <https://doi.org/10.1111/pce.1394820>
- Rosner, B. (1983). Percentage points for a generalized ESD many-outlier procedure. *Technometrics*, 25(2), 165-172.
- Russo, M., & Honermeier, B. (2017). Effect of shading on leaf yield, plant parameters, and essential oil content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 7, 27-34.
- Sabah, E.; Omayma, B.; Elidrissi, M.; Bouymajane, A; Choukrad, M'barek. (2020) Comparative Study of Chemical -Composition and Physico-Chemical Characteristics of *Thymus Vulgaris*'s Essential Oil Harvested from Deraa-Tafilalet's Region (Morocco) with Previous Studies. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3574468>
- Santos, R. P., Da Cruz, A. C. F., Iarema, L., Kuki, K. N., & Otoni, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. *Ceres*, v. 55, n. 4, 2008.
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.

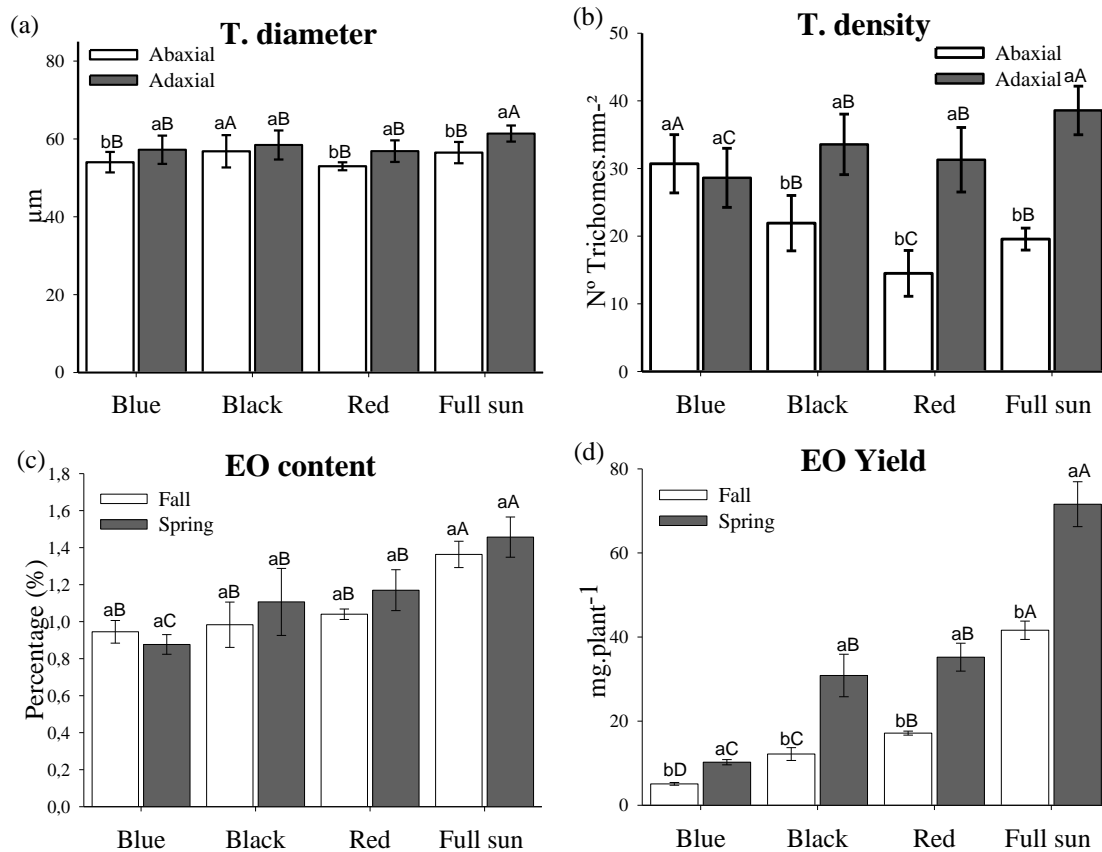
- Schiphorst, C., & Bassi, R. (2020). Chlorophyll-Xanthophyll Antenna Complexes: In Between Light Harvesting and Energy Dissipation. In *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms* (pp. 27-55). Springer, Cham.
- Silva, T.C.; Pinto, J.E.B.P. ; Pacheco, F.V.; Roza, H.L.H.; Lordêllo , D.M.S.; Bertolucci, S.K.V. (2018).The growth, photosynthetic pigments and essential oil composition of monocropped and intercropped lemon balm with yarrow. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 40, e35506, 2018.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Sivakumar, D., Jifon, J., & Soundy, P. (2018). Spectral quality of photo-selective shade nettings improves antioxidants and overall quality in selected fresh produce after postharvest storage. *Food reviews international*, 34(3), 290-307.
- Stagnari, F., Di Mattia, C., Galieni, A., Santarelli, V., D'Egidio, S., Pagnani, G., & Pisante, M. (2018). Light quantity and quality supplies sharply affect growth, morphological, physiological and quality traits of basil. *Industrial Crops and Products*, 122, 277-289.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. Editora Artmed, 6ª edição.
- Taulavuori, K., Pyysalo, A., Taulavuori, E., & Julkunen-Tiitto, R. (2018). Responses of phenolic acid and flavonoid synthesis to blue and blue-violet light depends on plant species. *Environmental and Experimental Botany*, 150, 183-187.
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Trindade, H. (2019). Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. *Industrial Crops and Products*, 134, 89-99.
- Valladares, F., Laanisto, L., Niinemets, Ü., & Zavala, M. A. (2016). Shedding light on shade: ecological perspectives of understory plant life. *Plant Ecology & Diversity*, 9(3), 237-251.
- 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.
- You, J., & Chan, Z. (2015). ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in plant science*, 6, 1092.
- Zhang, X., Niu, M., da Silva, J. A. T., Zhang, Y., Yuan, Y., Jia, Y., ... & Ma, G. (2019). Identification and functional characterization of three new terpene synthase genes

involved in chemical defense and abiotic stresses in *Santalum album*. BMC plant biology, 19(1), 1-18.

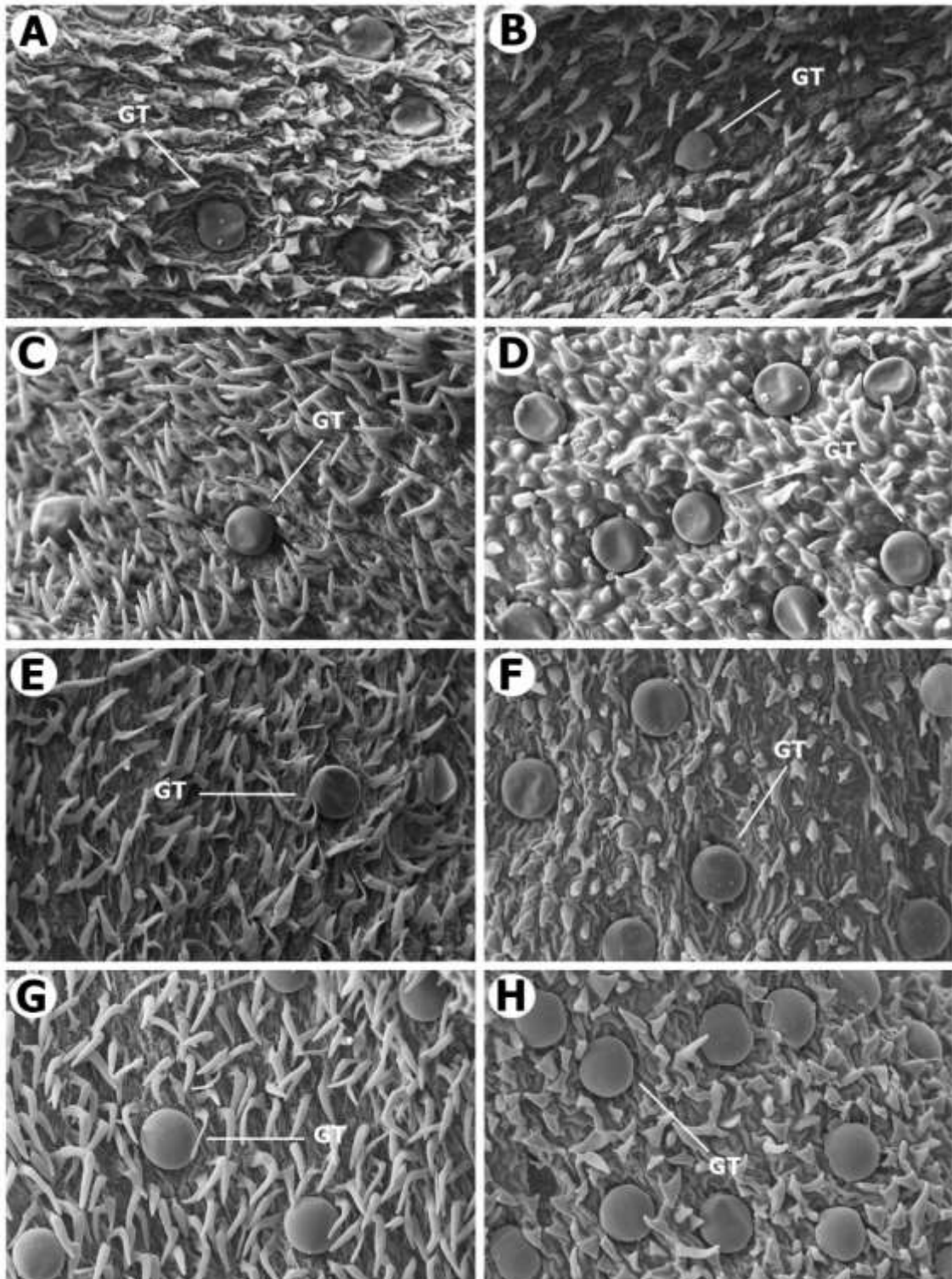
Zrig, A., Tounekti, T., Hegab, M. M., Ali, S. O., & Khemira, H. (2016). Essential oils, amino acids and polyphenols changes in salt-stressed *Thymus vulgaris* exposed to open-field and shade enclosure. Industrial Crops and Products, 91, 223-230.



**Figure 1.** Growth of *Thymus vulgaris* grown under blue, black and red nets and Full sun in the fall and spring seasons. a: leaf dry weight (LDW); b: stem dry weight (SDW); c: root dry weight (RDW); and d: total dry weight (TDW). \* Averages followed by the same capital letter between the shading conditions and the same lower case letter within the shading condition, do not differ significantly by the Scott-Knott test (5%).



**Figure 2.** Diameter (µm) and density (Number of trichomes mm<sup>2</sup>) of trichomes of glandular (abaxial and adaxial part of leaves) and content (%) and yield (mg plant<sup>-1</sup>) of essential oil of leaves (Fall and spring seasons) of *Thymus vulgaris* grown under blue, black and red nets and Full sun. Averages followed by the same uppercase letter between the shading conditions and the same lowercase letter within the shading condition, do not differ significantly by the Scott-Knott test (5%).



**Figure 3.** Glandular trichomes (GT) of the abaxial (A, C, E and G) and adaxial (B, D, F and H) of *Thymus vulgaris* grown under blue nets (A and B), black (C and D) and red (E and F) and Full sun (G and H).

**Table 1.** Averages of maximum and minimum temperatures and radiation within the blue, black and red nets and Full sun in the fall (03/22 to 06/30 2018) and spring (09/09 to 16/12 2018) seasons

Treat.	Maximum temp.		Minimum temp.		Radiation	
	----- °C -----				-- $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ --	
	fall	spring	fall	spring	fall	spring
Blue	23.56	24.40	13.80	17.10	551	854
Black	22.66	24.71	13.76	17.18	620	1131
Red	24.24	25.67	15.41	16.91	805	834
Full sun	26.66	27.90	14.99	17.41	1661	2361

**Table 2.** Effect of oxidative stress of *Thymus vulgaris* grown under blue, black and red nets and Full sun in the fall and spring seasons. Total phenols in mg of galic acid equivalents / g of dry leaf (mg GA  $\text{g}^{-1}$ ); Total antioxidant capacity (TAC) in mg of ascorbic acid equivalents / g of dry leaf (mg AAE  $\text{g}^{-1}$ ); Radical oxygen absorbance capacity (ORAC) expressed in  $\mu\text{mol}$  equivalent of Trolox/g dry leaf ( $\mu\text{mol ET mg}^{-1}$ ); and DPPH, Antioxidant Activity Index (AAI),

Treat.	Total Phenols		TAC		ORAC		DPPH	
	fall	spring	Fall	spring	Fall	spring	Fall	spring
	---- mg GAE $\text{g}^{-1}$ ----		mg AAE $\text{g plant}^{-1}$		$\mu\text{mol mg plant}^{-1}$		----- AAI -----	
Blue	34.38bB	42.82aD	35.82bC	48.90aC	0.65bD	1.12aC	0.65bB	1.48aC
Black	38.89bC	48.93aC	42.43bB	48.61aC	0.80bC	1.30aB	0.99bA	1.59aC
Red	54.31bA	54.50aB	39.53bB	50.03aB	1.45aA	1.11bC	0.68bB	1.73aB
Full sun	56.72bA	61.42aA	48.28bA	55.79aA	1.29bB	1.68aA	1.11bA	1.86aA
Mean	46.07 b	51.92 a	41.51 b	50.83 a	1.05 b	1.30 a	0.86 b	1.66 a

\* Means followed by the same uppercase letter in a column and the same lowercase letter in a line do not differ significantly by the Scott-Knott test (5%).

**Table 3.** Chlorophyll *a*, Chlorophyll *b* and carotenoids from *Thymus vulgaris* leaves grown under blue, black and red nets and full sun in the fall and spring seasons.

Treat.	Chlorophyll <i>a</i>		Chlorophyll <i>b</i>		Chlorophyll total		Carotenoids	
	fall	spring	Fall	spring	fall	spring	fall	spring
	----- mg g $\text{FW}^{-1}$ -----							
Blue	2.12 aA	1.81 bA	1.39 aC	1.03 bD	3.51 aB	2.85 bB	0.48 aA	0.42 bA
Black	2.06 aA	1.83 bA	1.75 aA	1.95 aA	3.81 aA	3.77 aA	0.46 aA	0.35 bA
Red	1.95 aB	1.84 bA	1.68 bB	1.81 aB	3.63 aB	3.66 aA	0.41 aB	0.37 aA
Full sun	1.70 aC	1.30 bB	0.59 bD	1.49 aC	2.29 bC	2.80 aB	0.49 aA	0.38 bA
Mean	1.96 a	1.70 b	1.35 b	1.57 a	3.31 a	3.27 a	0.46 a	0.38 b

\* Means followed by the same uppercase letter in a column and the same lowercase letter in a line do not differ significantly by the Scott-Knott test (5%).

**Table 4.** Chemical composition of the essential oil of *Thymus vulgaris* leaves grown under blue, black and red nets and full sun.

Compounds	IR	Blue		Black		Red		Full sun	
		Fall	Spr.	Fall	Spr.	Fall	Spr.	Fall	Spr.
$\alpha$ -Thujene	925	0.26	0.06	0.30	0.27	0.42	0.19	0.37	0.30

1-Octen-3-ol	977	2.11	2.20	1.82	2.21	1.87	2.26	1.68	2.23
Myrcene	991	0.84	0.56	1.04	1.06	1.18	0.95	1.22	1.19
3-Octanol	995	0.26	0.21	0.22	0.19	0.20	0.17	0.16	0.18
$\alpha$ -Phellandrene	1005	0.08	0.06	0.10	0.11	0.12	0.11	0.10	0.10
$\alpha$ -Terpinene	1016	0.61	0.65	0.88	1.05	0.98	1.05	0.83	0.94
$\rho$ -Cymene	1023	12.38	5.01	10.32	8.97	12.74	8.14	12.13	12.81
Sylvestrene	1027	0.34	0.21	0.36	0.36	0.41	0.33	0.39	0.41
1,8-Cineole	1030	0.49	0.33	0.42	0.45	0.52	0.42	0.53	0.79
$\gamma$ -Terpinene	1057	5.94	7.34	8.55	9.49	8.56	9.74	9.05	9.13
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1065	1.60	1.33	1.39	1.25	1.46	1.25	1.39	1.08
Linalool	1100	2.08	2.15	1.99	2.11	2.00	2.13	1.85	2.22
Borneol	1164	2.02	1.16	1.61	1.05	1.60	0.99	1.40	1.09
Terpinen-4-ol	1176	0.34	0.55	0.36	0.48	0.32	0.49	0.34	0.59
Carvacrol methyl ether	1245	2.13	1.51	1.91	1.22	1.69	1.27	1.55	0.77
Thymol	1297	61.00	68.16	62.10	62.67	59.17	64.57	60.30	58.83
Carvacrol	1303	2.04	2.86	2.02	2.86	2.16	2.92	2.34	3.33
Thymol acetate*	1356	0.13	0.16	0.21	nd	0.14	0.11	0.19	0.13
(E)-Caryophyllene	1420	1.82	1.61	1.70	1.46	1.58	1.46	1.50	1.15
Geranyl propanoate	1476	0.12	0.42	0.32	0.38	0.32	0.37	0.33	0.36
Caryophyllene oxide	1586	0.31	0.25	0.23	0.23	0.20	0.21	0.24	0.32
Total		97.60	97.98	97.85	97.88	97.63	98.03	97.91	97.91
Compounds number		21	21	21	20	21	21	21	21

\* Compounds that were not identified in all treatments.

**Table 5.** Majors compounds of the essential oil of *Thymus vulgaris* leaves grown under blue, black and red nets and full sun.

Treat.	$\rho$ -cymene			$\gamma$ -terpinene			Thymol		
	Fall	Spr.	mean	Fall	Spr.	mean	Fall	Spr.	mean
Blue	12.38aB	5.01bD	8.70D	5.94bC	7.34aC	6.64C	61.00bB	68.16aA	64.58A
Black	10.32aC	8.97bB	9.65C	8.55bB	9.49aB	9.02B	62.10aA	62.67aB	62.39A
Red	12.74aA	8.14bC	10.44B	8.56bB	9.74aA	9.15A	59.17bB	64.57aA	61.87A
Full sun	12.13bB	12.81aA	12.47A	9.05aA	9.13aB	9.09A	60.30aB	58.83aB	59.57B
Mean	11.89 a	8.73 b		8.03 b	8.93 a		60.64 b	63.66 a	

\* Means followed by the same capital letter in a column and lower case in a line do not differ by the Scott-Knott test (5%)



**Artigo 2 – A adubação orgânico reduz o estresse oxidativo e maximiza o rendimento de timol e a produção vegetativa de *Thymus vulgaris* L.<sup>2</sup>**

**Organic fertilization reduces oxidative stress and maximizes thymol yield and vegetative production of *Thymus vulgaris* L.**

**Resumo**

As técnicas de manejo de cultivo, como a adubação, exercem influência significativa no metabolismo da planta e, conseqüentemente, no crescimento vegetativo, produção e composição química do óleo essencial. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes fontes de fertilizantes sobre as características fitotécnicas, o estresse oxidativo e a produção de timol de *Thymus vulgaris* L. O experimento foi conduzido em vasos de 3 dm<sup>3</sup> contendo solo e areia (2:1) + os tratamentos (sem adubação, adubo orgânico e fertilizante químico). Para a adubação orgânica utilizou-se 8 Kg m<sup>-2</sup> de uma mistura equitativa de esterco bovino, caprino e codorna. A adubação química seguiu a recomendação proposta por Baranauskiene et al (2003). As plantas foram colhidas 120 dias após o transplante das mudas. As variáveis avaliadas foram: peso seco de folhas, caule, raiz e total, teor de clorofila *a*, clorofila *b*, total e carotenoides, nutrientes foliares, polifenóis totais, capacidade antioxidante total (TAC), Capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC), captura de radicais livres DPPH, teor de óleo essencial e produção, teor e rendimento de timol. Houve incrementos significativos nas variáveis avaliadas com a adubação orgânica e redução dos indicadores de estresse oxidativo. A aplicação da adubação orgânica resultou em ganhos no peso seco das plantas e acúmulo de nutrientes em folhas secas de *T. vulgaris*. Para as variáveis quantitativas do óleo essencial e de timol, a adubação orgânica foi significativamente superior aos demais tratamentos, destacando o teor e o rendimento de timol. Conclui-se que plantas de *T. vulgaris* adubadas com fertilizante orgânico maximizam sua produção vegetal e o rendimento de compostos de interesse, como o timol, possivelmente por indicarem um equilíbrio entre melhoria na produção vegetativa e a eliminação de espécies reativas de oxigênio.

**Palavras-chave:** Adubação química; macronutrientes; micronutrientes; equilíbrio nutricional; composição química.

---

<sup>2</sup> Versão preliminar para a revista **Scientia Horticulturae**

## 1 Introdução

Tomilho, orégano e manjeriço são condimentos que pertencem à família Lamiaceae, sendo de ampla utilização na culinária brasileira e no mundo (Sharafzadeh e Zare, 2011). O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é cultivado em muitos países, especialmente nas áreas rurais e, além de condimento, possui uso potencial contra infecções do sistema intestinal e infestações, como ancilóstomos, ascarídeos, bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e leveduras (Hosseinzadeh et al., 2015).

Dos compostos conhecidos do tomilho, o timol é o mais importante e atrai considerável atenção devido à sua aplicação farmacêutica e de conservante de alimentos (Hosseinzadeh et al., 2015; Bistgani et al., 2019). O timol é biossintetizado em plastídios de tricomas secretores glandulares nas plantas de tomilho, sendo encontrado nas superfícies dos tecidos aéreos e armazenados no espaço subcuticular dos tricomas (Crocoll, 2011; Bistgani et al., 2019). O interesse no timol vem crescendo devido a suas diferentes funcionalidades, como antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatório, antibacteriano, antifúngico, antidiarreico, anti-helmíntico, analgésico, digestivo, abortivo, anti-hipertensivo, espermicida, despigmentante, antileishmanial, anticolinesterase, inseticida e muitos outros (Jyoti et al., 2019).

A nutrição mineral influencia diretamente no crescimento e no desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, no incremento de produtividade (Fallah et al. 2020). Neste sentido, a adubação orgânica tem se destacado no cultivo de espécies medicinais e condimentares, principalmente porque as composições nutricionais das plantas variam muito e os fertilizantes orgânicos conseguem atender a nutrição uma grande diversidade de espécies de plantas (Bibiano, et al. 2019). Além disso, os fertilizantes orgânicos são insumos de baixo custo, associados a propriedades desejáveis do solo, incluindo melhoria das qualidades físicas, químicas e biológicas (Trani et al., 2013).

Como já bem estabelecido pela literatura, a nutrição da planta influencia seu crescimento e metabolismo e, conseqüentemente, podem ser observadas alterações na composição qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários bioativos (Fallah et al. 2020; OStadi et al., 2020). A composição química do óleo essencial é influenciada por fatores ambientais, como a disponibilidade de água, luz, temperatura, umidade, tipo de solo, nutrição, etc. (Maik et al., 2014). Assim, investigar o efeito de diferentes condições de manejo dessa espécie é importante para definir estratégias de produção locais que maximizem o crescimento vegetativo, teor e qualidade química de plantas com interesses condimentares e medicinais.

Em geral, as tensões ambientais causam danos potenciais ao padrão normal de desenvolvimento das plantas, refletindo em redução do rendimento produtivo (Ahanger et al., 2018). Vários estresses abióticos levam à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas, que são altamente reativas e tóxicas e causam danos a proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, o que acaba resultando em estresse oxidativo (Gil e Tuteja, 2010). As ROS, incluindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânions superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) são subprodutos de metabolismos fisiológicos e são controlados com precisão por sistemas de defesa antioxidante enzimática e não enzimática que trabalham em conjunto (You & Chan, 2015). O sistema de defesa antioxidante não-enzimáticos (ácido ascórbico, ASH; glutathiona, GSH; compostos fenólicos, alcaloides, aminoácidos não proteicos e  $\alpha$ -tocoferóis) é uma forma de apontar a situação do balanço oxidativo, uma vez que qualquer grau de variação em suas concentrações podem servir como sinais para a melhoria ou intensificação do estresse (Ahanger et al., 2018; Mahomoodally et al., 2019).

A literatura relata que a aplicação de fertilizantes orgânicos afeta positivamente o crescimento de plantas medicinais e condimentares, como também a produção e composição de seu óleo essencial e até mesmo sobre o estresse oxidativo (Bonacina et al., 2017; Bibiano, et al. 2019). Há pesquisas que demonstraram respostas positivas do cultivo de tomilho à adubação orgânica com compostagem, biofertilizantes, pó de rocha fosfato e esterco de gado, ovelha e galinha (Hendawy et al., 2010; Skubij e Dzida, 2016; Sharaf EL-Din et al., 2019). Entretanto, análises completas que interagem dados de estresse oxidativo, fitotécnicos, fitoquímicos e nutricionais são praticamente inexistentes para esta espécie. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tipo de adubação sobre o estresse oxidativo, características fitotécnicas e a produção de timol de *Thymus vulgaris* L.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Delineamento e condução do experimento

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos, sendo controle (sem adubação), químico (adubado com fertilizante químico) e orgânico (esterco), com sete repetições, duas plantas por vaso e seis vasos por repetição, totalizando 126 plantas. As mudas foram obtidas por estaquia de plantas matrizes de *Tomilho*, cujo exsicata foi depositada no herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) sob número de registro 58576. As estacas (com  $\pm 5$  cm) foram acondicionadas em bandejas de isopor de 128 células utilizando o substrato comercial Tropstrato HA<sup>TM</sup> e mantidas

em estufa com irrigação automatizada. As mudas com tamanho de 10 a 15 cm (45 dias de idade) foram transplantadas para vasos de 3 dm<sup>3</sup> contendo os tratamentos. Para o preparo do substrato misturou-se solo e areia grossa na proporção de 2:1. O solo utilizado no substrato foi coletado da camada de 0 a 20 cm de profundidade de um Latossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 1997) no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil. As características químicas do substrato foram as seguintes: pH em água = 5,4; K (mg dm<sup>-3</sup>) = 25,89; P-Rem (mg L<sup>-1</sup>) = 15,22; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, H+Al (cmolc dm<sup>-3</sup>) = 0,68; 0,05; 0,07; 2,93; índice de saturação de bases (V%) = 21,35; matéria orgânica (dag kg<sup>-1</sup>) = 1,03; Zn, Fe, Mn, Cu, B e S (mg dm<sup>-3</sup>) = 0,46; 43,3; 15,34; 1,38; 0,02; 1,6 respectivamente.

O tratamento adubado com fertilizante químico seguiu a recomendação de Baranauskiene et al. (2003). A dose do adubo químico foi equivalente a 135 kg ha<sup>-1</sup> de N, 120 kg ha<sup>-1</sup> de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e 150 kg ha<sup>-1</sup> de potássio (K<sub>2</sub>O). Os fertilizantes utilizados como fonte destes nutrientes foram a ureia (45 % N), superfosfato simples (18% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 18 % Ca; 11 % S) e cloreto de potássio (58 % K<sub>2</sub>O). Correspondendo assim, a aplicação por vaso de 45 mg de ureia, 100 mg de superfosfato simples e 39 mg de cloreto de potássio, sendo que o N e o K<sub>2</sub>O foi parcelado em três aplicações.

A dose utilizada para adubação orgânica foi de 8 kg m<sup>-2</sup>, sendo este uma mistura de esterco bovino, caprino e codorna curtidos, em proporções iguais. Essa dose correspondeu a aplicação de 120g de esterco por vaso no momento do preparo do substrato. A análise do adubo orgânico indicou os seguintes valores: Relação C/N = 23; Umidade (65° C) e carbono orgânico = 88 e 308 (g kg<sup>-1</sup>); N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, Ca, Mg e S (g kg<sup>-1</sup>) = 16, 17, 25, 47, 4 e 3; Cu, Fe, Zn, Mn, B (mg kg<sup>-1</sup>) = 42, 2787, 169, 466 e 105.

O experimento foi conduzido de 16/11/2018 a 16/03/2019 sob pleno sol no campo experimental situada nas coordenadas geográficas 21° 14' S e 45° 00 W, a 918 m de altitude. Para condução deste experimento o turno de rega foi de dois dias, com uma lâmina d'água aplicada de 13 mm nos primeiros 60 dias e de 26 mm até o final do experimento, a fim de manter o substrato com umidade entre 70 e 90 % da capacidade de campo. As variáveis avaliadas após 120 dias do transplante das mudas foram: peso seco das folhas, caule, raiz e total, nutrientes foliares; conteúdos de clorofila *a*, clorofila *b*, total, carotenoides, polifenóis totais, Capacidade Antioxidante Total (TAC), Capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC), captura de radicais livres DPPH, teor de óleo essencial e teor, rendimento e produtividade agrícola de timol.

## 2.2 **Peso seco da biomassa vegetal**

Para obtenção do peso seco da biomassa vegetal cada planta foi separada em folhas, caule e raízes e, então, submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada a 37 °C até o peso constante. Posteriormente, com o auxílio de balança semianalítica foi obtido o peso seco das folhas (LDW), peso seco do caule (SDW), peso seco da raiz (RDW) e peso seco total (TDW), expressos em g planta<sup>-1</sup>.

## 2.3 **Análise foliares de macronutrientes e micronutrientes**

Amostras de folhas secas de cada tratamento foram enviadas 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<sup>-1</sup> de peso seco de folha e os micronutrientes em mg kg<sup>-1</sup> 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 **Ensaio indicativo de estresse oxidativo**

### 2.4.1 **Preparo das amostras**

Folhas de tomilho foram previamente pulverizadas em moinho de facas. Pesou-se 50 mg diretamente para microtubos e procedeu-se a extração com 1 mL de solução hidroalcoólica 50% por sonicação a 50 Hz, empregando dois ciclos de 15 minutos. Ao final de cada ciclo as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram reunidos obtendo-se um extrato a 25 mg mL<sup>-1</sup>. Os extratos foram armazenados em freezer a -4 °C até análises.

### 2.4.2 **Fenóis Totais**

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu com modificação e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (Sigma-Aldrich, EUA) por g de peso seco de folha (mg GAE g<sup>-1</sup>). O método descrito por Singleton et al. (1999) foi modificado para o extrato hidroetanólico de tomilho da seguinte forma: 50 µL de extrato foram misturados com 100 µL de reagente Folin-Ciocalteu (0,2 N) em uma microplaca de 96 poços por 5 min e, em seguida, 125 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%) foi adicionado. Todas as amostras foram incubadas a temperatura ambiente no escuro por 20 min., e absorbância mensurada a 760 nm foi lida contra um branco. A concentração da curva de calibração ( $y =$

14.314x + 0.157;  $R^2 = 0,9986$ ) variou de 0,125 a 0,0078125 mg mL<sup>-1</sup> em uma solução etanólica de ácido gálico.

### 2.4.3 Captura de radicais livres DPPH

Os extratos também foram testados quanto à sua capacidade de eliminar os radicais livres DPPH de acordo com o método de Rivas et al. (2000), adaptado para uma microplaca de 96 poços. Um volume de 15 µL de diferentes diluições do extrato foram submetidos a reação com 280 µL de uma solução etanólica de 0,2mM de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil - Sigma-Aldrich, EUA). As absorvâncias foram medidas a 517 nm, após incubação por de 90 minutos à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos pelo Índice de Atividade Antioxidante (AAI) e foi calculada segundo a fórmula:

$$AAI = \frac{\text{Concentração final de DPPH } (\mu\text{g.mL}^{-1})}{IC50(\mu\text{g.mL}^{-1})}$$

A equação e a interpretação dos dados seguiu a metodologia proposta por Sherer e Godoy (2009), onde o extrato da planta é considerado de fraca atividade antioxidante ( $AAI \leq 0,5$ ); moderada atividade antioxidante ( $0,5 \leq AAI \leq 1,0$ ); forte atividade antioxidante ( $1,0 \leq AAI \leq 2,0$ ); e, muito forte atividade antioxidante ( $AAI \geq 2,0$ ).

### 2.4.4 Atividade antioxidante total / ensaio de fosfomolibdênio (TAC)

A atividade antioxidante total (TAC) das amostras foi avaliada de acordo com Prieto et al. (1999), onde a redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de um agente redutor (antioxidante), forma um complexo verde de fosfomolibdato (V). Uma alíquota de 50 µL da solução da amostra foi combinada com 1 mL da solução reagente (0,6 M de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 28 mM de fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) e 4 mM de molibdato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>); as três soluções foram misturadas em quantidades proporcionais) em um eppendorf de 2 mL. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 95 ° C por 90 min. Após as amostras terem atingido à temperatura ambiente, 100 µL da solução foram transferidos para os poços de uma microplaca e a absorvância a 695 nm foi registrada. A avaliação foi feita em quintuplicada, e os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido ascórbico / g de folha seca (mg AAE / g). A curva de calibração ( $y = 0,6418x + 0,1227$ ,  $R^2 = 0,9961$ ) construída com solução aquosa de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, EUA) na faixa de trabalho de 5 a 0,0390625 mg mL<sup>-1</sup> foi utilizada nos cálculos dos resultados.

#### **2.4.5 Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC) / sequestro do Radical Peroxil**

O ensaio da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) é baseada na inibição da oxidação induzida por oxiradicais de dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropionamidina) (AAPH) por substâncias com propriedades antioxidantes. Com o tempo, o ROS, gerado a partir da decomposição termal do AAPH, extinguirá o sinal da sonda fluorescente fluoresceína de acordo com o método descrito por Cao et al. (1993) com modificações. Os resultados são expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid) equivalente (ET) por mg de peso seco de folha ( $\mu\text{mol}$  ET / mg). O método foi modificado da seguinte forma: em microplaca, 30  $\mu\text{L}$  da amostra foi combinada com 150  $\mu\text{L}$  de Fluoresceína ( $1,0 \times 10^{-6}$  mM), em seguida as amostras foram incubadas a 37°C no escuro por 10 min. e no momento da leitura, 30  $\mu\text{L}$  do AAPH (2,2'-Azobis (2-metil-propionamidina) dihidrocloreto) foram adicionados em cada poço. Para o branco e a curva de Trolox, substituiu-se a amostra por 30  $\mu\text{L}$  Tampão fosfato (pH= 7,4) e 30  $\mu\text{L}$  de cada concentração de Trolox, respectivamente. Para que a avaliação siga a fluorescência ( $\lambda_{\text{ex}}=485\text{nm}$  e  $\lambda_{\text{em}}=520\text{nm}$ ) leituras foram feitas a cada minuto, durante 150 min. em um leitor de microplacas. Os resultados foram determinados por meio da área sob a curva (AUC) de cada amostra e subtraiu-se da área sob a curva do branco encontrando a área líquida:  $\text{AUC}_{\text{líquida}} = \text{AUC}_{\text{amostra}} - \text{AUC}_{\text{branco}}$ . A análise foi feita em quintuplicata. A concentração da curva de calibração ( $y = 1E^{+11}x + 296396$ ;  $R^2 = 0,9983$ ) variou de 125 a 7.8125  $\mu\text{M}$  de Trolox.

#### **2.5 Análise de pigmentos fotossintéticos**

A extração e doseamento de pigmentos fotossintéticos seguiram o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979) com adaptações propostas por Barnes et al. (1992). Em resumo, folhas frescas (50 mg) foram pesadas diretamente em tubos de Falcon cobertos com papel alumínio, adicionados 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e, incubados em estufa a 65 °C por 48 h. As amostras foram preparadas em quadruplicata. A saturação do DMSO seguiu o protocolo de Santos et al. (2008) com modificações. Para isto, o DMSO foi saturado com carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) na proporção de 5 g  $\text{L}^{-1}$  de DMSO, sob agitação constante por quatro horas, e então filtrado duas vezes à vácuo em papel de filtro duplo. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min.

Em seguida, três alíquotas de 3 mL de cada réplica foram transferidas para uma cubeta de quartzo, e os valores de densidade óptica em 480, 649 e 665 nm foram lidos em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control® (versão 3.37), contra DMSO saturado 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:

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

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

$$\text{Carotenoides}_{480}: (1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b)/220.$$

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  $\text{mg g}^{-1}$  matéria fresca.

## 2.6 Análises quantitativas do óleo essencial e produtividade agrícola de timol

### 2.6.1 Teor de óleo essencial

A destilação do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado durante 90 minutos. Amostra de 15 g de folhas secas ( $n = 5$ ) foram depositadas em um balão de destilação de 2 L, contendo 1 L de água destilada. Partição líquido-líquido com diclorometano ( $3 \times 5$  mL) foi realizada para a purificação do óleo essencial. A fase orgânica foi reunida e tratada com cerca de 5 g de sulfato de magnésio anidro durante 30 min. Após esse período a solução foi filtrada e o solvente evaporado a temperatura ambiente, sob capela de exaustão de gases. Posteriormente, o óleo essencial foi acondicionado em frasco âmbar sob refrigeração a 4 °C (Brasil, 2010). O teor de óleo essencial (%) representa a média do peso do óleo (mg) em 100 mg de peso seco das folhas das 5 repetições.

### 2.6.2 Doseamento de timol

O óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa (CG) em sistema Agilent 5890A, empregando coluna HP-5MS (30 cm de comprimento x 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno x 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura). O óleo essencial foi diluído em acetato de etila (1%, v/v) e 1  $\mu\text{L}$  foi injetado no modo *split* a uma razão de 30:1. Utilizou-se o hélio como gás de arraste com fluxo de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ . As temperaturas do injetor e do detector foram 220 e 250 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, mantida por 1,5 min, seguida por uma rampa de temperatura de 3 °C  $\text{min}^{-1}$  até 100 °C. Posteriormente, por uma rampa de temperatura de 4 °C



min<sup>-1</sup> até 200 °C e por fim, uma rampa de 10 °C min<sup>-1</sup> até 240°C. Para identificação da presença de timol, uma amostra autêntica (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, pureza declarada  $\geq 99,5\%$ ) foi analisada nas mesmas condições. Os índices de retenção relativos a uma série de *n*-alcanos C8 a C20 foram calculados de acordo com Van der Dool e Kratz (1963) para os picos correspondentes e comparados a índices de retenção da literatura (DAVIES, 1990; ADAMS, 2017). Para a identificação inequívoca da identidade do pico supostamente correspondente ao timol, o óleo essencial foi analisado em cromatógrafo gasoso Agilent<sup>®</sup> 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent<sup>®</sup> MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG. A identidade do pico do timol nas amostras foi confirmada por comparação com os espectros de massas do banco de dados da biblioteca da National Institute of Standards and Technology (NIST, 2008)

Para as análises quantitativas de timol, empregou-se o método do padrão externo (AOAC, 2013). A faixa de linearidade (2,0 a 10,0 µg) foi estimada na área conhecida de uma solução de referência de timol e área correspondente ao pico do timol nas amostras. A linearidade foi determinada pela injeção, em triplicata, de diferentes volumes de soluções de referência (2,5 e 5,0 µg mL<sup>-1</sup>). As curvas de calibração foram determinadas em relação a massa injetada de timol, em dois dias consecutivos. Os dados obtidos para cada curva analítica de timol foram submetidos a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) foram calculados. As curvas obtidas nos dois dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de covariância ( $p < 0,05$ ). A partir da curva analítica média ( $y = 43350186.76x + 10093465.13$ ),  $R^2 = 0,9979$ ) determinaram-se a produção (mg g<sup>-1</sup> de óleo essencial (EO)), o teor (g 100 g<sup>-1</sup> de folha seca); e o rendimento (µg planta<sup>-1</sup>) de timol. O rendimento foi determinado multiplicando-se a produção de timol e a massa de óleo produzido por planta.

## 2.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram, primeiramente, avaliados quanto à sua homogeneidade e normalidade, sendo em seguida submetido ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SISVAR 5.3 (Ferreira, 2011). O software Statistica<sup>®</sup>, versão 13.3 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA) foi utilizado para a análise de componentes principais (PCA).

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Análise de crescimento das plantas

O crescimento vegetativo de *Tomilho* aumentou significativamente com a adubação em comparação ao tratamento controle, independentemente da adubação química ou orgânica (Figura 1). Entretanto, o adubo orgânico influenciou de forma mais expressiva no acúmulo de matéria seca dos órgãos e total do tomilho. No que se refere ao peso seco das folhas (LDW), a adubação orgânica proporcionou um incremento de 148.5% quando comparado ao controle e 66.6% quando comparado ao adubo químico. O incremento na matéria seca do caule (SDW) com adubo orgânico foi de cerca de 158% e 56%, quando comparado ao controle e adubo químico, respectivamente. O incremento percentual proporcionado pelo adubo orgânico no peso seco da raiz (RDW) foi ainda maior, chegando a 270% em relação ao controle e de 52% comparado ao adubo químico. Conseqüentemente, o peso seco total (TDW) foi maior na adubação orgânica chegando a ser quase 3 vezes maior que o controle e 1,6 vezes maior que a adubação química.

Estes resultados corroboram com as observações de Sharaf EL-Din et al. (2019) e Askary et al (2018) onde se observou que o tomilho respondeu positivamente as variáveis de crescimento quando submetido a adubação orgânica e química, sendo identificado também pelos mesmos autores superioridade de fertilizantes orgânicos ao químico. Conforme Alinejad et al. (2020), os fertilizantes orgânicos aumentam o crescimento vegetativo das espécies cultivadas sob sua adubação em comparação com os fertilizantes químicos, por fornecer todos os nutrientes essenciais ao mesmo tempo, e disponibilizá-los de forma gradativa na solução do solo. Além disso, os fertilizantes orgânicos podem trazer outros benefícios, como a melhoria da estrutura, aeração, armazenamento de água e drenagem interna do solo; melhoria na adsorção de nutrientes, aumento gradativo da capacidade de troca de cátions do solo; e aumento na biodiversidade de microorganismos úteis que agem na solubilização de fertilizantes diversos de maneira a liberar nutrientes para as plantas (Trani et al., 2013).

De modo geral, o conteúdo de macronutrientes e micronutrientes foi significativamente impactada pela adubação, sendo observada redução do teor nos tratamentos que foram adubados com esterco e fertilizante químico (Tabela 1). Os valores observados no presente trabalho estão muito próximos aos descritos na literatura para os macronutrientes e micronutrientes em tomilho: N: 15.3 a 16.1 g kg<sup>-1</sup>; P: 2.5 a 3.5 g kg<sup>-1</sup>; K: 7.5 a 9.3 g kg<sup>-1</sup>; Ca: 11.2 a 11.8 g kg<sup>-1</sup>; Mg: 1.47 a 1.53 g kg<sup>-1</sup> e S: 2.4 a 2.9 g kg<sup>-1</sup>; B: 31 a 34,3 mg kg<sup>-1</sup>; Cu: 7.4 a

9 mg kg<sup>-1</sup>; Fe: 200 a 242 mg kg<sup>-1</sup>; Mn: 45 a 55 mg kg<sup>-1</sup>; Zn: 25.6 a 30.5 mg kg<sup>-1</sup> (Mills e Jones, 1996; Esetlili et al., 2014).

Os maiores teores de P, K e S (2.0, 12.6 e 2.3 g kg<sup>-1</sup> (respectivamente) foram observados no controle, assim como os de Cu, Fe, Mn e Zn (15.1, 241.6, 145.3 e 60.4 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente) (Tabela 1). Os menores conteúdos de P, Cu e Fe (1.6 g kg<sup>-1</sup>, 10.3 mg kg<sup>-1</sup> e 129 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente) foram observados na adubação orgânica, sendo estes inferiores até mesmo da adubação química. Por outro lado, o acúmulo de nutrientes nas plantas de tomilho foram totalmente significativos para o tratamento com adubação orgânica (Tabela 2). O ganho expressivo de massa das plantas adubadas, principalmente com adubo orgânico, fizeram com que houvesse um efeito de “diluição” de grande parte dos nutrientes, principalmente os de alta e moderada mobilidade na planta. Dessa forma, é possível afirmar a adubação orgânica promoveu maior absorção e acúmulos de nutrientes em plantas de tomilho.

Por outro lado, os maiores conteúdos de Ca e B (14.4 g kg<sup>-1</sup> e 40.6 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente) foram observados na adubação química. O aumento no conteúdo de Ca se justifica pela adição deste elemento na adubação química com superfosfato simples que possui 18% de Ca. Considerando a participação de Ca e B nas mesmas funções ou processos, Mills e Jones (1996), Kanwal et al. (2008) e Barker e Pilbeam (2015) concluíram que ambos os nutrientes devem estar balanceados para o adequado crescimento da planta, podendo ocorrer assim, o aumento sinérgico deste elemento. Uma possibilidade é que as funções do B na estabilização de componentes da parede celular dependem da atuação conjunta do Ca, provavelmente auxiliando no metabolismo ou incorporação do Ca na parede celular, ou seja, o B atua na biossíntese da parede celular auxiliando o Ca na deposição e formação de dímeros dos polissacarídeos pécticos envolvidos na construção destas estruturas (González-Fontes et al., 2010; Garrone, 2015; Turan et al., 2018).

### 3.2 Ensaios indicativos de estresse oxidativo

A exposição de plantas a condições ambientais desfavoráveis, como o estado nutricional, pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O acúmulo de ROS como resultado de vários estresses ambientais é uma das principais causas da perda de produtividade das culturas em todo o mundo, uma vez que as ROS afetam muitas funções celulares. O equilíbrio entre a produção de ROS e a eliminação no local e no tempo adequados desempenham um papel crucial na sobrevivência das plantas sob estresse ambiental (Gil e Tuteja, 2010).

Plantas adubadas de tomilho indicaram sofrer menos estresse oxidativo que as plantas não adubadas (Tabela 3). Verificou-se que o conteúdo de polifenóis totais variou entre todos os tratamentos, sendo o menor valor (51.72 mg GAE / g) obtido com a adubação química e o maior (65.58 mg GAE / g) no controle. A capacidade antioxidante total (TAC) seguiu a mesma tendência dos fenóis, onde o controle mostrou uma TAC quase 33% superior à adubação química e 23% superior a adubação orgânica. Capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC) e a atividade da DPPH mostraram a mesma tendência, onde o controle foi o mais ativo e estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em relação à adubação química e orgânica. O Índice de Atividade Antioxidante (AAI) em DPPH classificou o controle como de alta atividade antioxidante e as adubações químicas e orgânica como atividade antioxidante moderada, o que conclui bem as interferências dos tratamentos.

Bistgani et al., (2019) observaram que os extratos metanólicos de tomilho que mostram os maiores valores da atividade de eliminação de radicais livres são aqueles com o maior conteúdo de componentes fenólicos, o que corrobora com os resultados da presente pesquisa (Tabela 3). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos nas plantas é devido, principalmente, às suas propriedades redox e estrutura química, que podem desempenhar um papel importante na neutralização das espécies reativas de oxigênio, como radicais livres, oxigênio e peróxidos singleto e tripleto (Asif, 2015).

O maior estresse oxidativo observado no controle já era esperado porque essas plantas estão sob estresse nutricional. Sob alguns tipos de estresse (luminoso, déficit hídrico, deficiências nutricionais, etc) há no metabolismo vegetal o aumento da geração de ROS, que são altamente danosas às plantas promovendo peroxidação de lipídeos, membranas, clorofilas, tilacoides, proteínas, DNA e RNA (Gil e Tuteja, 2010; Taiz et al., 2017). As ROS são produzidas constantemente em células vegetais como resultado do metabolismo aeróbico na maioria das organelas intracelulares, como mitocôndrias, peroxissomos e cloroplasto, (You e Chan, 2015). Em cada célula aeróbia, é observado um equilíbrio dinâmico entre a geração de ROS e o sistema de defesa antioxidante. O estresse abiótico aumenta a geração de ROS e interrompe o equilíbrio em favor da reação oxidativa e cria estresse oxidativo (Gil e Tuteja, 2010; Hasanuzzaman et al., 2017). Nas células vegetais, a principal fonte de geração de ROS são os o cloroplasto, isso ocorre porque sob a maioria das tensões, ocorre uma indulgência energética adequada na fotossíntese e uma redução sucessiva do oxigênio molecular produz ROS, incluindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânions superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (You e Chan, 2015; Hasanuzzaman et al., 2017).

Os menores valores dos Fenóis e TAC do tratamento químico (Tabela 3) pode ter como principal fator, os elevados valores do conteúdo de Ca (Tabela 1). O Ca tem uma função significativa na tolerância ao estresse, desencadeia atividades de enzimas antioxidantes e diminui a peroxidação lipídica das membranas celulares em condições de estresse abiótico (Siddiqui et al. 2010). Além disso, o Ca é essencial para estabilizar a permeabilidade da membrana celular, devido à captação seletiva de íons, e aumenta a rigidez da parede celular, induzindo a reticulação das pectinas da parede (Turan et al., 2018).

### 3.3 Pigmentos fotossintéticos

Os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *b*, carotenoides) são essenciais para estimar o potencial fotossintético das plantas, pela sua ligação direta com a absorção e transferência de energia luminosa, e conseqüentemente influencia no crescimento, desenvolvimento e na adaptação das plantas á condições bióticas e abióticas, (Taiz et al., 2017). Plantas com maiores teores de clorofila são capazes de produzir taxas fotossintéticas mais altas, principalmente, pelo seu potencial de assimilação de "quanta" no mesmo período e condição (Chappelle et al., 1992).

De modo geral, as concentrações de clorofila e carotenoides foram afetados pelos tratamentos pelos quais as plantas foram submetidas. O conteúdo de clorofila *a* e total foram significativamente maiores no controle e sob adubação orgânica, de forma que, o conteúdo destes pigmentos foram 0,90 e 1,92 mg g<sup>-1</sup> de peso fresco no controle e 0,89 e 1,82 mg g<sup>-1</sup> de peso fresco no adubo orgânico, respectivamente, ao passo que estes conteúdos diminuiram com a adubação química 0,75 e 1,65 mg g<sup>-1</sup> de peso fresco, respectivamente (Figura 2). O conteúdo de clorofila *b* e carotenoides tendeu a diminuir sob qualquer tipo de adubação, de modo que as plantas apresentaram o maior conteúdo de clorofila *b* e carotenoides no controle (figura 2).

Trabalhando com os padrões de expressão gênica chave da biossíntese de pigmento Liu et al. (2010), Shi et al. (2012) e MingYue et al. (2018) observaram que a aplicação de fertilizante orgânico pode acentuadamente promover a formação de cloroplasto (clorofilas), desenvolvimento e acumulação pigmento plastidial ( $\beta$ -caroteno, violaxantina, lutea e neoxantina). Segundo Alinejad, et al. (2020) a diminuição de clorofila pode ser devida à síntese reduzida dos principais complexos de pigmentos fotossintéticos codificados pela família de genes precursor de cloroplasto (Proteína de ligação à clorofila a-b de LHCII tipo I - CAB); como também pela destruição dos complexos pigmento-proteína que protegem o aparato fotossintético, ou mesmo por danos oxidativos de lipídios e proteínas da clorofila (Komenda e Sobotka, 2016). Provavelmente, este é um mecanismo de proteção do aparelho fotossintético

contra os danos, que é considerado essencial para a adaptação das plantas em curto prazo aos fatores de estresse (Wang e Grimm, 2015).

No processo fotossintético, a luz absorvida por carotenoides e/ou clorofila *b* nas proteínas do complexo de colheita de luz (LHC) é rapidamente transferida para a clorofila *a* e, após, para outros pigmentos antena intimamente associados ao centro de reação (Schiphorst e Bassi, 2020). O complexo LHC está envolvido em processos reguladores do aparato fotossintético da planta, assim o aumento das clorofilas (*a*, *b* e total) e carotenoides observado no tratamento controle pode ser um mecanismo de regulação da planta para absorver mais energia e compensar a reduzida área fotossintética (Folhas – Figura 1). Por outro lado, os valores mais elevados de clorofila *a* e total observados no tratamento com adubação orgânica pode ter sido estimulado pelos elevados teores de nitrogênio (Tabela 1), uma vez que os íons magnésio compartilham elétrons com os átomos de nitrogênio da clorofila *a*.

Além de sua função como pigmentos acessórios, os carotenoides desempenham um papel essencial na fotoproteção das plantas (Muzzopappa e Kirilovsky, 2020). Os carotenoides são responsáveis pela extinção de oxigênios singletos, portanto, o aumento de seu conteúdo sob estresse também pode estar relacionada a essa função no tratamento controle do presente estudo. Este resultados se complementam e justificam os ensaios indicativos de estresse oxidativo ao identificar maior estresse nas plantas cultivadas com o tratamento controle.

### 3.4 Análises quantitativas do óleo essencial e de timol

O tomilho é uma das principais fontes de timol, contém entre 10 e 64% deste composto em seu óleo essencial. O interesse no timol vem crescendo devido a sua ampla gama de possibilidades funcionais nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (Salehi et al., 2018). Vários estudos têm demonstrado os possíveis usos terapêuticos do timol para o tratamento de distúrbios que afetam os sistemas digestivo, respiratório, nervoso e cardiovascular, o que vem estimulando a formulação de produtos farmacêuticos, nutracêuticos e de cosmecêuticos (Jyoti et al., 2019; Salehi et al., 2018). Além disso, já se utiliza o timol como antissépticos médicos e agentes de cicatrização de feridas, conservantes e aromatizante de alimentos, desinfetante de superfície, pesticida (fungicida, inseticida, acaricida, rodenticida, antimicrobiano, etc.), antioxidante e reagente de laboratório, bem como em perfumaria e microscopia (Komaki et al., 2016).

As variáveis de respostas quantitativas do óleo essencial e de timol foram consideravelmente afetadas conforme o tipo de tratamento (Tabela 4). O teor de óleo essencial e a produção de timol foram significativamente superior quando utilizou-se a adubação

orgânica, sendo observado um incremento médio de 16.3 e de 7.8%, respectivamente, quando comparado a média dos demais tratamentos. Para as demais variáveis quantitativas de timol a adubação orgânica também foi significativamente superior aos demais tratamentos, porém o teor e rendimento de timol também foram significativamente diferentes entre o controle e a adubação química. O aumento expressivo do teor de timol com a adubação orgânica proporcionou um ganho de 16,4% quando comparado ao controle e ainda maior quando comparado ao adubo químico chegando a 33,3%. Para o rendimento de timol, o adubo orgânico trouxe um ganho de quase seis vezes mais timol por planta quando comparado ao controle e de mais do dobro quando comparado ao adubo químico.

Dados sobre o conteúdo de óleo essencial, bem como a biossíntese de timol e seu acúmulo variam em diferentes tecidos ou em resposta a diferentes fatores e estímulos ambientais (temperatura, precipitação, solo, nutrição mineral, etc) em espécies vegetais de Lamiaceae, como *T. vulgaris*, já estão bem documentados na literatura (Majdi et al., 2017; Sharaf EL-Din et al., 2019). O timol é um monoterpene fenólico biossintetizado a partir do difosfato de isopentenil (IDP) e difosfato de dimetilalil (DMADP), que são derivados da via MEP (metil eritritol fosfato) localizada em plastídeos (Majdi et al., 2017). Dessa forma, correlacionado a promoção do desenvolvimento e acúmulo de pigmento plastidial proporcionado pela aplicação de adubo orgânico (Liu et al., 2010, Shi et al., 2012; MingYue et al., 2018), pode-se sugerir no presente trabalho que uma possível explicação para o aumento de timol no tratamento com adubação orgânica está vinculado ao aumento dos plastídeos.

### 3.5 Análise de componentes principais (PCA)

A PCA foi aplicada para reduzir o número de variáveis estudadas (matéria seca das folhas, caule e total, variáveis quantitativas de pigmentos fotossintetizantes, fenóis totais e atividade antioxidante). O objetivo do PCA foi avaliar as interações existentes entre as variáveis e os tipos de adubação, de forma que pudesse concluir melhor os resultados. A análise de componentes principais (PCA) resultou em 100% da variação total. A PC1 contribuiu com 63,96% e PC2 contribuiu com 36,04% da variação total (Figuras 3 e 4).

No gráfico de scores da figura 3, observa-se a separação da PC1 em dois grupos: as adubações química e orgânica (scores positivos) e tratamento controle (score negativo). Neste mesmo gráfico, a PC2 foi separada em controle e adubação orgânica (scores negativos) e adubação química (score positivo). Estas separações deixam cada tratamento em quadrantes distintos do gráfico mostrando que existe uma marcante diferença entre os tratamentos. Além disso, é notável observar que o tratamento controle (sem adubação) influenciou positivamente

os teores de clorofilas totais, carotenoides e os indicadores de estresse oxidativo. Em geral, a adubação orgânica forneceu à planta condições favoráveis para o crescimento vegetativo e produção de óleo essencial e timol. Observa-se também que existe correlação positiva entre os fenóis e as clorofilas totais e, entre o conteúdo de óleo essencial e timol.

Ademais, a análise dos vetores mostrou que os indicadores de estresse oxidativo e carotenoides estão inversamente correlacionados com as variáveis de crescimento vegetativo da planta, corroborando a hipótese de um possível estresse ambiental causado pela indisponibilidade de nutrientes. Os mecanismos iniciais sensores de estresse na planta desencadeiam uma resposta subsequente que compreende múltiplas rotas de transdução de sinal como: ROSs, ativação de reguladores de transcrição, acumulação de hormônios vegetais, dentre outros. Os sinais específicos de estresse que emergem dessas rotas, por sua vez, ativam ou suprimem diversas malhas que podem permitir a continuidade do crescimento e da reprodução sob condições de estresse ou capacitam a planta a sobreviver ao estresse até o retorno de condições mais favoráveis (Taiz et al., 2017).

Corroborando aos resultados da PCA anterior, a análise dos scores da figura 4 também indicou separação marcante entre os tratamentos. A PC1 separou as adubações química e orgânica do tratamento controle, e a PC2 separou o controle e adubação orgânica do tratamento adubação química. Isto indica que o teor de macronutrientes e micronutrientes nas folhas de *Tomilho* também foi altamente influenciado pela composição química dos substratos. A adubação orgânica favoreceu o aumento do teor de N e o adubo químico o conteúdo de Ca e B. Todos os demais nutrientes (P, K, Mg, S, Zn, Mn, Cu e Fe) tiveram correlação positiva com o tratamento controle.

Os dados da PCA confirmam resultados anteriormente já discutidos e apontam outros não observados. O aumento do teor de N, por exemplo, justifica o aumento no conteúdo de pigmentos na adubação orgânica pelas funções estruturais destes nutrientes na clorofila. Isto também justifica o ganho expressivo de biomassa neste tratamento, uma vez que cerca de 90% do N total da planta está na forma orgânica e, é assim, que desempenha as suas funções como componente estrutural de macromoléculas e constituintes de enzimas (Faquin e Rodas, 2015). Esse resultado propõe que a adubação orgânica favorece uma otimização do N pela planta. Alinejad et al (2020) também observaram que o conteúdo de pigmentos e biomassa foram maiores usando fertilizantes orgânicos, principalmente esterco de aves, devido à acessibilidade das plantas de *Datura stramonium* L. à absorção de nitrogênio e outros nutrientes envolvidos na formação de pigmentos durante a estação de crescimento.



O Mg apontou correlação fortemente positiva com o tratamento controle (Figura 4). A função mais conhecida do Mg é a de compor a molécula da clorofila, que são porfirinas magnesianas; o Mg corresponde a 2,7% do peso das mesmas e representa cerca de 15 a 20% do Mg total das folhas das plantas (Faquin e Rodas, 2015), essa informação pode justificar aqui o aumento no conteúdo de clorofilas do tratamento controle. Além desta, outras importantes funções são desempenhadas pelo Mg, como a ativação enzimática, dentre elas muitas das responsáveis pela atividade antioxidante das plantas (Siddiqui et al., 2018).

#### **4 Conclusões**

Plantas de *Tomilho* que não receberam fertilização sofrem estresse oxidativo impactando negativamente no crescimento vegetativo e na produção de timol. Portanto, o cultivo de *Tomilho* exige suplementação nutricional com adubação química ou orgânica. Além do mais, esta espécie responde melhor em ganho de matéria seca e produção de timol com a adubação orgânica, possivelmente por indicarem um equilíbrio entre melhoria das características fitotécnicas e a eliminação de espécies reativas de oxigênio.

Embora nenhuma análise de custo-benefício tenha sido realizada, algumas considerações pertinentes podem ser inferidas a partir dos resultados apresentados. Os ganhos de rendimento proporcionados pela adubação orgânica traz uma indicação congruente de que a depender da disponibilidade local, do custo de transporte e do preço de compra, o cultivo orgânico de *Thymus vulgaris* deve ser priorizado.

#### **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

#### **Referências**

Adams, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (5 online ed.), Texensis Publishing (2017).

- Ahanger, M. A., Gul, F., Ahmad, P., & Akram, N. A. (2018). Environmental Stresses and Metabolomics—Deciphering the Role of Stress Responsive Metabolites. In *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress* (pp. 53-67). Academic Press.
- Alinejad, S., Sarabi, V., Bakhtvari, A. R. S., & Hashempour, H. (2020). Variation in physiological traits, yield and secondary metabolites of jimsonweed (*Datura stramonium* L.) under different irrigation regimes and nutrition systems. *Industrial Crops and Products*, 143, 111916.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC. AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2013. <[http://www.eoma.aoac.org/app\\_k.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_k.pdf)> Acesso em: 11 jul 2020.
- Asif, M. (2015). Chemistry and antioxidant activity of plants containing some phenolic compounds. *Chemistry international*, 1(1), 35-52.
- Askary M., M.A. Behdani, S. Parsa, S. Mahmoodi, M. Jamialahmadi Water stress and manure application affect the quantity and quality of essential oil of *Thymus daenensis* and *Thymus vulgaris*. *Ind. crops prod.*, 111 (2018), pp. 336-344
- Baranauskienė, R., Venskutonis, P. R., Viškelis, P., & Dambrauskienė, E. (2003). Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 51(26), 7751-7758.
- Barker, A. V., & Pilbeam, D. J. (2015). *Handbook of plant nutrition*. CRC press.
- Barnes, J. D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., & Davison, A. W. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 32(2), 85–100. doi:10.1016/0098-8472(92)90034-y
- Bibiano, C. S., de Carvalho, A. A., Bertolucci, S. K. V., Torres, S. S., Corrêa, R. M., & Pinto, J. E. B. P. (2019). Organic manure sources play fundamental roles in growth and qualitative production of essential oil from *Dysphania ambrosioides* L. *Industrial Crops and Products*, 139, doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111512
- Bistgani, Z. E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., & Morshedloo, M. R. (2019). Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 135, 311-320./ doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.055
- Bonacina, C., Trevizan, C. B., Stracieri, J., dos Santos, T. B., Gonçalves, J. E., Gazim, Z. C., & de Souza, S. G. H. (2017). Changes in growth, oxidative metabolism and essential oil

- composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) subjected to salt stress. Australian Journal of Crop Science, 11(12), 1665.
- Brazil. Ministry of health national health surveillance agency. Resolution RDC 49, 23 November 2010. Approves the Brazilian Pharmacopoeia (5th ed), Official Gazette, Brasília (2010); n. 1, p. 198-199.
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. Free radical biology and medicine, 14(3), 303-311.
- Chappelle, E. W., Kim, M. S., & McMurtrey III, J. E. (1992). Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): an algorithm for the remote estimation of the concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids in soybean leaves. Remote sensing of environment, 39(3), 239-247.
- Crocoll, C. Biosynthesis of the Phenolic Monoterpenes, Thymol and Carvacrol, by Terpene Synthases and Cytochrome P450s in Oregano and Thyme. PhD Dissertation Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany, Germany (2011)
- Davies, N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases J. Chromatogr. A, 503 (1990), pp. 1-24, 10.1016/S0021-9673(01)81487-4
- Esetlili, B. C., Pekcan, T., Çobanoğlu, Ö., Aydoğdu, E., Turan, S., & Anac, D. (2014). Essential plant nutrients and heavy metals concentrations of some medicinal and aromatic plants. Tarım Bilimleri Dergisi - Journal of Agricultural Sciences, 239-247.
- Fallah, S., Mouguee, S., Rostaei, M., Adavi, Z., Lorigooini, Z., & Shahbazi, E. (2020). Productivity and essential oil quality of *Dracocephalum kotschyi* under organic and chemical fertilization conditions. Journal of Cleaner Production, v. 255, p. 11. doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120189
- Faquin, V., Rodas, C. L. (2015). Funções dos nutrientes nas plantas: guia de estudos. Lavras-MG : UFLA, p.135.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e agrotecnologia, 35(6), 1039-1042.
- Garrone, R. F. (2015). Interação cálcio e boro na fixação biológica de nitrogênio na soja: avaliação morfológica, ultraestrutural e da atividade da nitrogenase. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo

- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- González-Fontes, A.; Navarro-Gochicoa, T.; Camacho-Cristóbal, J. J.; Herrera-Rodríguez, M. B.; Quiles-Pando, C.; Rexach, J. Is Ca<sup>2+</sup> involved in the signal transduction pathway of boron deficiency? New hypotheses for sensing boron deprivation. *Plant Science*, Shannon, v. 217-218, p. 135-139, 2014. doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.011
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Hossain, M., Mahmud, J. A., Rahman, A., Inafuku, M., ... & Fujita, M. (2017). Coordinated actions of glyoxalase and antioxidant defense systems in conferring abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 200.
- Hendawy, S. F., Ezz El-Din, A. A., Aziz, E. E., & Omer, E. A. (2010). Productivity and oil quality of *Thymus vulgaris* L. under organic fertilization conditions. *Ozean J. Appl. Sci*, 3(2), 203-216.
- Hiscox, J.D., And Israelstam, G.F. 1979. A method for the extraction of chloro- phyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57(12): 1332–1334. doi:10.1139/b79-163.
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(09), 635.
- Jyoti, Dheer, D., Singh, D., Kumar, G., Karnatak, M., Chandra, S., Verma, V. P., & Shankar, R. (2019). Thymol Chemistry: A Medicinal Toolbox. *Curr. Bioact. Compd.*, 15, 456-475.
- Kanwal, S.; Rahmatullah, K.; Aziz, M. T.; Maqsood, A.; Abbas, N. Critical ratio of calcium and boron in maize shoot for optimum growth. *Journal of Plant Nutrition*, Philadelphia, v. 31, p. 1535–1542, 2008.
- Komaki, A., Hoseini, F., Shahidi, S., & Baharlouei, N. (2016). Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6, 257–261.
- Komenda, J.; Sobotka, R. Cyanobacterial high-light-inducible proteins — Protectors of chlorophyll–protein synthesis and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, V. 1857(3), 2016, P. 288-295. doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.08.011.
- Liu, H. H., Zhao, M. Q., Wang, F. F., Zhang, X. J., Lv, Z. X., & Li, T. P. (2010). Effects of combined application of organic fertilizer and chemical fertilizer on plastid pigment and its degrading products in flue-cured tobacco [J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 5.
- Mahomoodally, F., Aumeeruddy-Elalfi, Z., Venugopala, K. N., & Hosenally, M. (2019). Antiglycation, comparative antioxidant potential, phenolic content and yield variation of

essential oils from 19 exotic and endemic medicinal plants. *Saudi journal of biological sciences*, 26(7), 1779-1788.

- Maik, K. et al. Moderate drought and signal transducer induced biosynthesis of relevant primary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*), greater celandin (*Chelidonium majus*) and parsley (*Petroselinum crispum*). *Industrial Crops and Products*, v. 64, p. 158-166, 2015.
- Majidi, M., Malekzadeh-Mashhady, A., Maroufi, A., & Crocoll, C. (2017). Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with thymol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 152-162.
- Mills H.A., Jones Benton J. *Plant Analysis Handbook II*. MicroMacro Publishing, Inc. 1996:422.
- MingYue, H., Niu, D., Wang, L., Lou, Y., Li, Y., Yang, S., ... & Cui, H. (2018). Effects of organic fertilizer application on the biosynthesis of plastid pigment in flue-cured tobacco. *Journal of Agricultural Science and Technology (Beijing)*, 20(4), 29-35.
- Muzzopappa, F., & Kirilovsky, D. (2020). Changing color for photoprotection: the orange carotenoid protein. *Trends in plant science*, 25(1), 92-104.
- NIST. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library/Analysis Program and Data for Microsoft Windows (05 ed), Shimadzu, USA (2008)
- Ostadi, A., Javanmard, A., Machiani, M. A., Morshedloo, M. R., Nouraein, M., Rasouli, F., & Maggi, F. (2020). Effect of different fertilizer sources and harvesting time on the growth characteristics, nutrient uptakes, essential oil productivity and composition of *Mentha piperita* L. *Industrial Crops and Products*, 148, doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112290.
- Prieto, P.; M. Pineda; M. Aguilar Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin e. *Analytical Biochemistry*, 269 (1999), pp. 337-341, 10.1006/abio.1999.4019
- Rivas, C.S.; J.C. Espín; H.J. Wichers. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 11 (2000), pp. 330-338, 10.1002/1099-1565(200009/10)11:5<330::AID-PCA534>3.0.CO;2-G
- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. D. M., Segura-Carretero, A., ... & Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1688-1706.

- Santos, R. P., Da Cruz, A. C. F., Iarema, L., Kuki, K. N., & Otoni, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. *Ceres*, v. 55, n. 4, 2008.
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.
- Schiphorst, C., & Bassi, R. (2020). Chlorophyll-Xanthophyll Antenna Complexes: In Between Light Harvesting and Energy Dissipation. In *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms* (pp. 27-55). Springer, Cham.
- Sharaf EL-Din, M. N.; H. A. Ahmed; M. M. Shalan; H. M. Hussien. The Effect of Organic and Bio-Fertilization on Vegetative Growth and Yield of Thyme (*Thymus vulgaris*, L.). *Journal of Plant Production*, 10(12), 1175-1185.
- Sharafzadeh, S.; Zare, M.. Effect of drought stress on qualitative and quantitative characteristics of some medicinal plants from Lamiaceae family. *Adv. Environ. Biol.* v. 5, n. 8, p. 2058–2062, 2011.
- Shi, H., Gu, S., Duan, W., Wang, J., Qian, H., Liu, Q., ... & Liu, G. (2012). Degradation of plastid pigment and its relationship with volatile catabolite content in cured leaves of different genotypes of flue-cured tobacco. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(16), 3346-3356.
- Siddiqui, M. H., Alamri, S. A., Al-Khaishany, M. Y., Al-Qutami, M. A., Ali, H. M., Al-Whaibi, M. H., ... & Alharby, H. F. (2018). Mitigation of adverse effects of heat stress on *Vicia faba* by exogenous application of magnesium. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(7), 1393-1401. doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.022
- Siddiqui, M. H., F. Mohammad, M. N. Khan, M. H. Al-Whaibi, and A. HA. Bahkali. 2010. Nitrogen in relation to photosynthetic capacity and accumulation of osmoprotectant and nutrients in Brassica genotypes grown under salt stress. *Agricultural Sciences in China* 9:671–80. doi:10.1016/S1671-2927(09)60142-5.
- Singleton, V.L.; R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*. Academic Press (1999), pp. 152-178
- Skubij, N., & Dzida, K. (2016). Effect of natural fertilization and the type of substrate on the biological value of the thyme herb (*Thymus vulgaris* L.). *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 15(6), 291-304.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. Editora Artmed, 6ª edição.

- Trani, P. E., Terra, M. M., Tecchio, M. A., Teixeira, L. A. J., & Hanasiro, J. (2013). Adubação orgânica de hortaliças e frutíferas. Campinas: IAC.
- Turan, M. A., Taban, S., Kayin, G. B., & Taban, N. (2018) Effect of boron application on calcium and boron concentrations in cell wall of durum (*Triticum durum*) and bread (*Triticum aestivum*) wheat, *Journal of Plant Nutrition*, 41:11, 1351-1357, DOI: 10.1080/01904167.2018.1450424
- Van H. Den Dool, P. Dec Kratz. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography *J. Chromatogr. A*, 11 (1963), pp. 463-471, 10.1016/S0021-9673(01)80947-X
- Wang, P., Grimm, B. Organization of chlorophyll biosynthesis and insertion of chlorophyll into the chlorophyll-binding proteins in chloroplasts. *Photosynth Res* 126, 189–202 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0154-5>
- 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.
- You, J., & Chan, Z. (2015). ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in plant science*, 6, 1092.

Tabela 1. Conteúdo de macronutrientes e micronutrientes em folhas secas de *Thymus vulgaris* L. cultivados com diferentes tipos de adubação (Control – Substrato; Chemical – Substrato adubado com fertilizante químico; Organic – Substrato adubado com adubo orgânico).

Macronutrients						
	N	P	Ca	K	Mg	S
----- g kg <sup>-1</sup> -----						
Control	11.2 a	2.0 a	11.9 b	12.6 a	2.4 a	2.3 a
Chemical	11.4 a	1.8 b	14.4 a	9.8 ab	2.3 a	2.0 ab
Organic	12.7 a	1.6 c	10.8 b	7.1 b	2.3 a	1.9 b
C.V. (%)	5.64	3.02	7.45	10.51	8.67	6.83
Micronutrients						
	B	Cu	Fe	Mn	Zn	
----- mg kg <sup>-1</sup> -----						
Control	33.0 b	15.1 a	241.6 a	145.3 a	60.4 a	
Chemical	40.6 a	12.6 b	187.7 b	68.9 b	25.9 b	
Organic	31.7 b	10.3 c	129.0 c	39.7 b	24.5 b	
C.V. (%)	5.70	2.21	6.84	8.20	5.73	

\*Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

Tabela 2. Acúmulo de macronutrientes e micronutrientes em folhas secas de *Thymus vulgaris* L. cultivados com diferentes tipos de adubação (Control – Substrato; Chemical – Substrato adubado com fertilizante químico; Organic – Substrato adubado com adubo orgânico).

Macronutrients						
	N	P	Ca	K	Mg	S
----- mg planta <sup>-1</sup> -----						
Control	24.4 c	4.3 c	25.9 c	27.3 b	5.2 c	5.0 c
Chemical	77.4 b	11.9 b	98.2 b	66.8 a	15.3 b	13.6 b
Organic	136.9 a	16.7 a	115.8 a	76.5 a	24.8 a	19.9 a
C.V.(%)	5.64	3.02	7.45	10.17	7.59	6.83
Micronutrients						
	B	Cu	Fe	Mn	Zn	
----- mg planta <sup>-1</sup> -----						
Control	0.072 c	0.033 c	0.525 b	0.316 b	0.131 c	
Chemical	0.277 b	0.086 b	1.279 a	0.469 a	0.177 b	



Organic	0.341 a	0.111 a	1.391 a	0.427 a	0.263 a
C.V.(%)	5.70	1.95	6.84	8.20	5.73

\*Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

Tabela 3. Efeito do tipo de adubação (Control – Substrato; Chemical – Substrato adubado com fertilizante químico; Organic – Substrato adubado com adubo orgânico) no conteúdo de Polifenóis Totais (Phenols) expresso em mg de equivalentes de ácido gálico / g de folha seca (mg GAE / g); capacidade antioxidante total (TAC) em mg de equivalentes ácido ascórbico / g de folha seca (mg AAE / g); Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) expressa em  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/ g de folha seca ( $\mu\text{mol ET} / \text{mg}$ ); e DPPH, Índice de Atividade Antioxidante (AAI), em folhas secas de *Thymus vulgaris* L..

	Phenols	TAC	ORAC	DPPH
	mg GAE/g	mg AAE/g	$\mu\text{mol ET} / \text{mg}$	AAI
Control	65.58 a	76.63 a	1.84 a	1.30 a
Chemical	51.72 c	57.71 c	1.58 b	0.82 b
Organic	62.14 b	62.17 b	1.60 b	0.77 b
C.V (%)	1.14	1.33	5.37	4.87

\*Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

Tabela 4. Teor de óleo essencial, produção de Timol (mg / g de óleo essencial (EO)), teor de Timol (g / 100 g de folha seca = %) e rendimento de Timol ( $\mu\text{g planta}^{-1}$ ) extraído das folhas secas de *Thymus vulgaris* L. cultivados com diferentes tipos de adubação (Control – Substrato; Chemical – Substrato adubado com fertilizante químico; Organic – Substrato adubado com adubo orgânico).

	Oil content	Timol	Timol contente	Timol yield
	%	mg g EO <sup>-1</sup>	%	$\mu\text{g planta}^{-1}$
Control	0.88 b	625.21 b	0.55 b	5.95 c
Chemical	0.84 b	604.31 b	0.48 c	16.53 b
Organic	1.00 a	662.57 a	0.64 a	34.51 a
C.V.(%)	8.46	1.60	1.65	2.98

\*Médias seguidas pela mesma letra dentro da coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

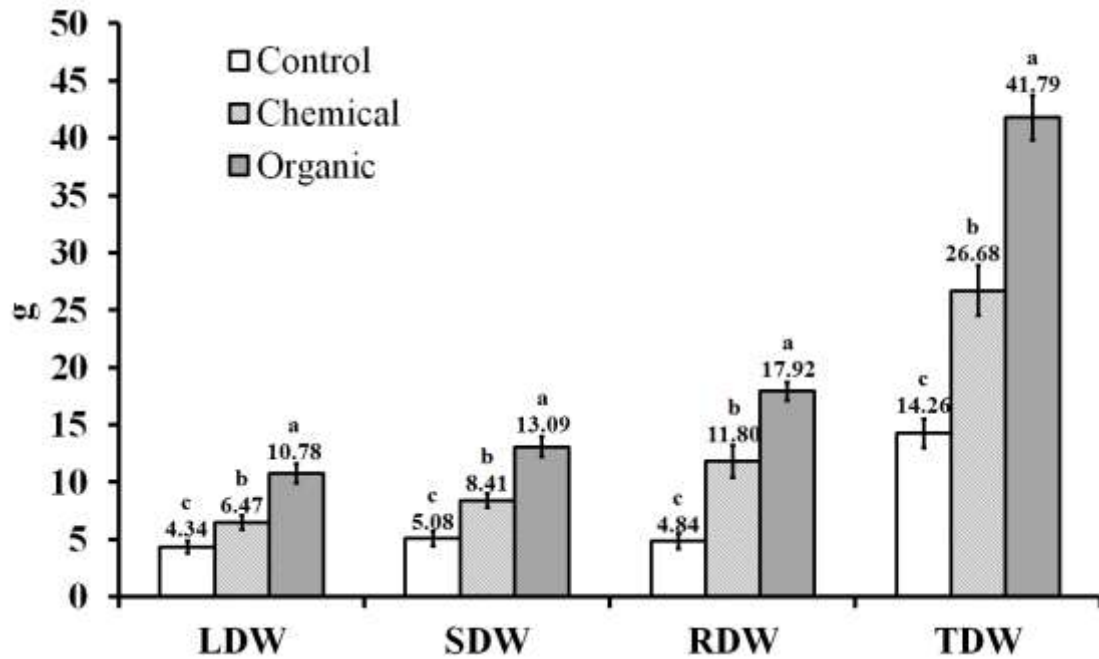


Figura 1. Peso seco das folhas (LDW), caule (SDW), raiz (RDW) e total (TDW) de *Thymus vulgaris* L. cultivados com diferentes tipos de adubação (Control – Substrato; Chemical – Substrato adubado com fertilizante químico; Organic – Substrato adubado com adubo orgânico). \*Médias seguidas pela mesma letra dentro da variável não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

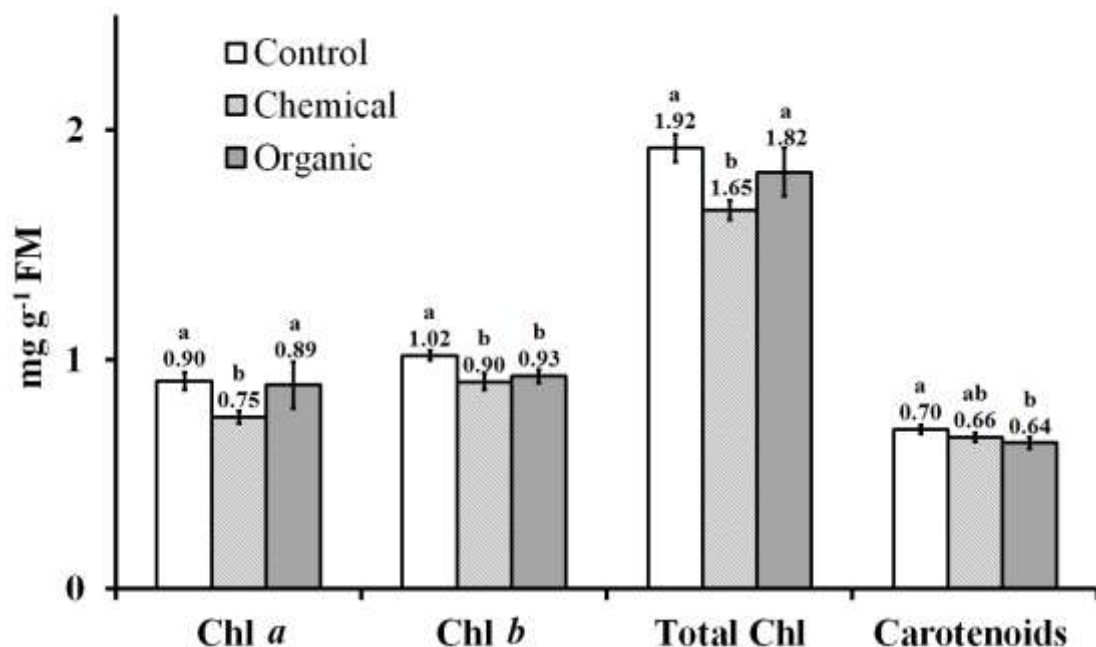


Figura 2. Clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides ( $\text{mg g}^{-1}$  de matéria fresca) de folhas de *Thymus vulgaris* L. cultivados com diferentes tipos de adubação (Control – Substrato; Chemical – Substrato adubado com fertilizante químico; Organic – Substrato adubado com

adubo orgânico). \*Médias seguidas pela mesma letra dentro da variável não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

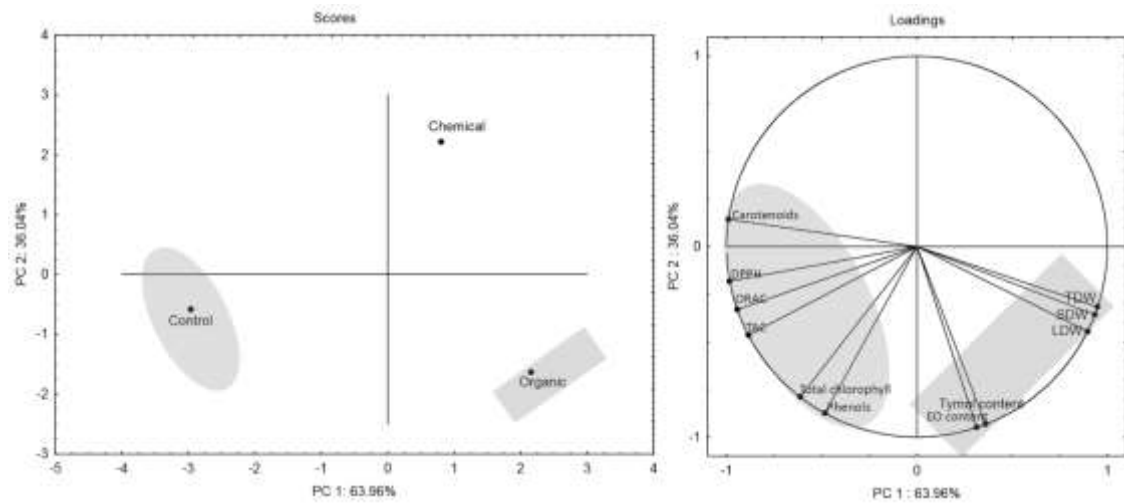


Figura 3. Análise de componentes principais (PCA) da correlação matricial construída usando dados de Peso seco das folhas (LDW), peso seco do caule (SDW), peso seco total (TDW), clorofila total, carotenoides, Polifenóis Totais (Phenols), capacidade antioxidante total (TAC), Oxygen radical absorbance capacity (ORAC), DPPH, teor de óleo essencial e produção de Timol de *Thymus vulgaris* L. cultivados com diferentes tipos de adubação (Control – Substrato; Chemical – Substrato adubado com fertilizante químico; Organic – Substrato adubado com adubo orgânico).

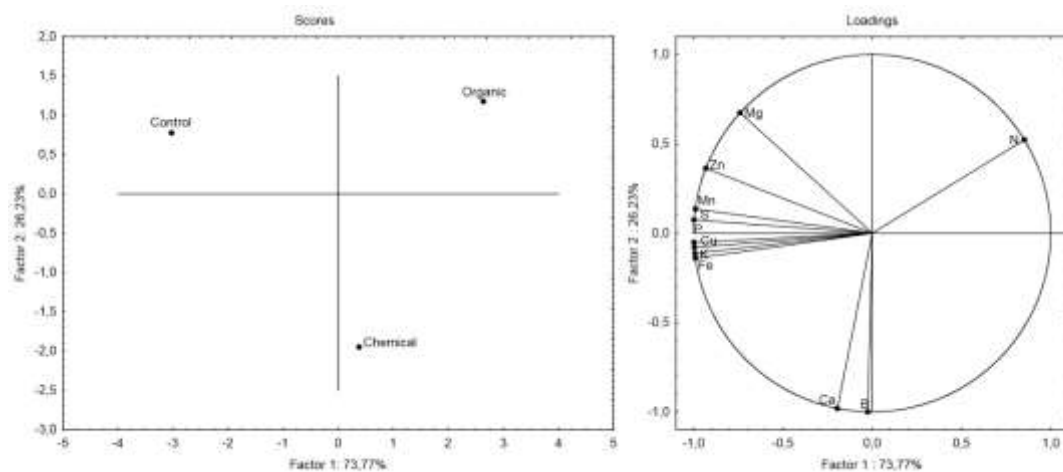


Figura. 4 Análise de componentes principais (PCA) da correlação matricial construída usando dados da quantidades de macronutrientes e micronutrientes de folhas secas de *Thymus vulgaris* L. cultivados com diferentes tipos de adubação (Control – Substrato; Chemical – Substrato adubado com fertilizante químico; Organic – Substrato adubado com adubo orgânico).

**Artigo 3 – Fertilization with different manure sources and doses provides quantitative-qualitative gains in the production of *Thymus vulgaris* L.<sup>3</sup>**

**Adubação com diferentes fontes e doses de esterco propicia ganhos quanti-qualitativos na produção de *Thymus vulgaris* L.**

**Abstract**

The cultivation of *Thymus vulgaris* L. requires management information that will result in strategic gains in plant and essential oil production. The objective of this study was to determine the influence of fertilization with different manure sources and doses on the vegetative, physiological, nutritional, and quantitative-qualitative growth characteristics of thyme and its essential oil yield. The treatments were as follows: control (without fertilization), chemical fertilization, and fertilization with three sources of manure (quail, cattle, and goat) at four doses (2, 4, 8, and 12 kg m<sup>-2</sup>). Significant differences were observed between manure sources and doses in virtually all response variables. In general, the plants showed linear and quadratic responses to manure doses. Quail and cattle manure resulted in higher dry weight gains than goat manure. The largest accumulations of most of the leaf nutrients were observed with 12 kg m<sup>-2</sup> cattle manure and quail manure. Higher production of reactive oxygen species was observed in plants fertilized with goat manure, which generally showed the lowest levels of macronutrients and micronutrients. Comparing the doses and types of manure, there were increases in essential oil yield that reached up to 710% in plants grown with 12 kg m<sup>-2</sup> cattle manure compared to the control treatment. Regarding the major constituent of the essential oil of thyme, thymol tended to increase with increasing doses of the three sources of organic fertilizers. In conclusion, choosing the right dose and source of manure are crucial to provide quantitative-qualitative gains in the cultivation of *T. vulgaris*. Doses between 8 and 12 kg m<sup>-2</sup> of cattle and quail manure are indicated to be the reference for new studies or even for application in large thyme crops.

**Keywords:** Quail manure; cattle manure; goat manure; fertilization management; nutritional balance; essential oil.

---

<sup>3</sup> Versão preliminar para a revista **Industrial Crops and Products**

## 1 Introduction

Plants of the genus *Thymus* (Lamiaceae) have been widely studied, mainly for their chemical-pharmacological aspects, and their main commercial interest is the production of essential oils (Tisserand, 2014; El Ansari et al., 2019). The species of this genus are known for their pleasant aroma and taste and as sources of bioactive compounds, so they are a source of medicinal, seasoning, and flavoring agents (Bistgani et al., 2018; Tohidi et al., 2019). In particular, *Thymus vulgaris* L. (thyme) is an economically important plant for its culinary, medicinal, and aromatic value, as well as for its flexibility to be cultivated under different environmental conditions (Hosseinzadeh et al., 2015; Mahdavi et al., 2020).

Thyme is a part of several important market segments and can be directly sold in its dehydrated form or in the form of essential oil. Dry thyme is the product obtained by drying the leaves and flowers of fresh thyme. Europe is the largest importer of dry thyme in the world, accounting for 50% of total world imports. The expected expansion of this market is driven by the healthy diet trend and the growing interest in specific cuisines, such as the Mediterranean (CBI, 2020). Another motivator of consumption is the growing interest in natural medicines, in which thyme is used as a medicinal herb or as an essential oil. The global market for thyme oil is segmented by application, such as pharmaceuticals, cosmetics, food products, fragrances, and oil-chemical industries. Such companies have increasingly invested in their future portfolio strategies to expand the market and obtain a competitive advantage in the global thyme essential oil market by 2025, according to an article published on the website of Persistence Market Research (Persistence..., 2021).

The chemical composition of the essential oil of *T. vulgaris* shows a predominance of monoterpenes (Mancini et al., 2015; Satyal et al., 2016; El Ansari et al., 2019). Due to variations in the volatile chemical profile, at least 20 chemotypes categorize this species (Satyal et al., 2016). Most commercial thyme oils are rich in thymol or carvacrol. The carvacrol chemotype contains up to 85% carvacrol, while the thymol chemotype contains no more than 65% thymol, in addition to containing 8–44%  $p$ -cymene (Thompson et al., 2003; Satyal et al., 2016)). Flavonoids, phenolic acids, saponins, tannins, steroids and triterpenes are also present in thyme (Fayad et al., 2013; Asha, Lizzy, 2017; Akbar, 2020).

Due to market demands, thyme producers need to combine agricultural productivity and quality (Pavela et al., 2018). Plant and essential oil production depend on genetic, environmental, and agrotechnical factors (Calin-Sanchez et al., 2013; Pavela et al., 2018).

Among the agronomic factors, fertilization is important due to its direct effect on the nutritional status of plants and, consequently, on all aspects involved in growth and development (Bistgani et al., 2018). In addition to its role in plant growth, production, and development, nutrition affects plant physiology, with consequent changes in secondary metabolism (Bistgani et al., 2018; Mahdavi et al., 2020).

Organic fertilizers have been gaining visibility in recent years and are already considered essential for improving agricultural production, especially in medicinal, seasoning, and aromatic plants that require quality control in all of its aspects (Zandvakili et al., 2017). Although the effects of different organic and chemical fertilizers in increasing plant productivity have been well documented (Bistgani et al., 2018; Pandey and Patra, 2015; Assis et al., 2020), in the case of thyme, information on the effects of these fertilizers on various parameters that may affect the agricultural productivity and quantitative-qualitative gains in the essential oil of thyme are incipient (Skubij et al., 2016; Amooaghaie and Golmohammadi, 2017; Noroozisharaf; Kaviani, 2018; Dzida et al., 2019).

Although information on the implications of organic fertilization in thyme is limited, what exists is very encouraging and promising. Amooaghaie and Golmohammadi (2017) reported improvement in growth, production of essential oil, and even the induction of systemic resistance in thyme as a result of organic fertilization (vermicomposting). Noroozisharaf and Kaviani (2018) demonstrated that the application of humic acid to the soil led to an increase in nutrient absorption and changes in the chemical composition of the essential oil of thyme under greenhouse conditions. However, complete analyses associating the implications of different sources and doses of organic fertilizers, investigating vegetative growth and other physiological, nutritional, oxidative stress, and quantitative-qualitative characteristics of essential oil, were not found in our literature searches. Thus, the objective of this study was to investigate the effect of fertilization with different manure sources and doses on the vegetative, physiological, nutritional, and quantitative-qualitative growth characteristics of thyme and its essential oil yield

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Experimental setup and procedure**

Thyme seedlings were obtained from cuttings from mother plants of the Medicinal Plant Garden of the Federal University of Lavras, Brazil. The herbaceous plant was identified and deposited in the herbarium of the Agricultural Research Company of Minas Gerais (EPAMIG)

under registration number 58576. Cuttings ( $\pm 5$  cm) were placed in 128-cell styrofoam trays using the commercial substrate Tropstrato HA<sup>TM</sup> and kept in an incubator with automated irrigation for 45 days ( $\pm 10$  cm). After this, they were transplanted into 6-dm<sup>3</sup> pots and kept in the field. The mixture used was soil obtained from the surface layer (0.0-0.2 m) of a dystroferric red Latosol (EMBRAPA, 1997) and sand at a ratio of 2:1. The chemical characteristics of the substrate were as follows: pH in water = 5.4; K (mg dm<sup>-3</sup>) = 25.89; P-Rem (mg L<sup>-1</sup>) = 15.22; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, and H+Al (cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>) = 0.68, 0.05, 0.07, and 2.93; base saturation index (V%) = 21.35; organic matter (dag kg<sup>-1</sup>) = 1.03; Zn, Fe, Mn, Cu, B, and S (mg dm<sup>-3</sup>) = 0.46, 43.3, 15.34, 1.38, 0.02, and 1.6, respectively. The irrigation followed a two-day irrigation schedule, with a water depth of 13 mm applied in the first 60 days and 26 mm until the end of the experiment, to keep the substrate moisture between 70 and 90% of field capacity.

The experiment was conducted in a completely randomized design with a total of 14 treatments: control (without fertilization), chemical fertilization, and fertilization with three sources of manure (quail, cattle and goat) at four doses (2, 4, 8, and 12 kg m<sup>-2</sup>), with five replicates and eight plants per replicate, totaling 560 plants. Two plants were used per pot. The experiment was harvested 120 days after transplanting the seedlings, at which time the following parameters were determined: leaf, stem, root and total dry weight (g plant<sup>-1</sup>); levels of leaf macronutrients- and micronutrients, chlorophyll *a*, *b*, and total, carotenoids and total polyphenols; concentration, yield, and chemical composition of the essential oil; and quantitative determinations of total antioxidant capacity (TAC), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), and DPPH free radical scavenging. The plants were dehydrated in a forced-air oven at 37 °C until reaching constant weight.

Chemical fertilization followed the recommendation of Malavolta (1981) for the cultivation of plants in pots, being doses equivalent to (in ppm): N – 300, P – 200, K – 150, Ca – 75, Mg – 15, S – 50, B – 0.5, Cu – 1.5, Fe – 5, Mo – 0.1, Zn - 5. The fertilizers used were urea (45% N), single superphosphate (18% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 18% Ca; 11% S), and potassium chloride (58% K<sub>2</sub>O). The other macronutrients and micronutrients were added using analytical-grade reagents. Analysis of the organic fertilizers generated the following values: a) cattle manure: C/N 28; organic carbon 309; N, P, K, Ca, Mg, and S (g kg<sup>-1</sup>) = 11, 5, 12, 7, 4, and 2; B, Cu, Fe, Mn, and Zn (mg kg<sup>-1</sup>) = 140, 57, 3381, 920, and 72; b) goat manure: C/N 32; organic carbon 411; N, P, K, Ca, Mg, and S (g kg<sup>-1</sup>) = 13, 5, 25, 9, 3, and 3; B, Cu, Fe, Mn, and Zn (mg kg<sup>-1</sup>) = 146, 15, 3498, 117, and 58; c) quail manure: C/N 8; organic carbon 203; N, P, K, Ca, Mg, and S (g kg<sup>-1</sup>) = 25, 41, 37, 124, 6 and 4; and B, Cu, Fe, Mn, and Zn (mg kg<sup>-1</sup>) = 30, 55, 1483, 360, and 377.

## 2.2 Leaf analysis

To determine the accumulation of N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Mn, Zn, and Fe in the dry leaves, samples from each treatment were analyzed in triplicate. The macronutrients are expressed in  $\text{g kg}^{-1}$ , and the micronutrients are expressed in  $\text{mg kg}^{-1}$  dry leaf weight.

## 2.3 Photosynthetic pigments

The extraction and analysis of photosynthetic pigments followed the method proposed by Hiscox and Israelstam (1979) with adaptations suggested by Barnes et al. (1992). Fifty milligrams of fresh leaves were weighed directly in Falcon tubes covered with aluminum foil, and 10 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) saturated with calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) was added, followed by incubation at  $65^\circ\text{C}$  for 48 h. DMSO saturation followed the protocol of Santos et al. (2008) with modifications. DMSO was saturated with  $\text{CaCO}_3$  at a ratio of  $5 \text{ g L}^{-1}$  DMSO under constant stirring for 4 hours. The solution was vacuum-filtered twice on double filter paper, followed by centrifugation at 6000 rpm for 10 min. The samples were prepared in quadruplicate.

The optical density values of the samples were measured at 480, 649, and 665 nm in a TECAN INFINITY M200 PRO spectrophotometer operated with the I-Control<sup>®</sup> data processing system (version 3.37). For this purpose, three 3-mL aliquots of each replica were used in a quartz cuvette. The optical density value of each sample was calculated by averaging the readings of the three aliquots against the blank. The wavelengths and the equations used for the calculations were based on the method of Wellburn (1994), where:

$$\text{Chlorophyll } a_{649} = (12.47 \times A_{665}) - (3.62 \times A_{649});$$

$$\text{Chlorophyll } b_{665} = (25.06 \times A_{649}) - (6.5 \times A_{665});$$

$$\text{Carotenoids}_{480} = (1000 \times A_{480} - 1.29 \times C_a - 53.78 \times C_b)/220.$$

Total chlorophyll ( $a + b$ ) was calculated by summing the results of the equations for chlorophyll  $a$  and  $b$ , and all results are expressed in  $\text{mg g}^{-1}$  fresh matter.



## 2.4 Oxidative stress

Abiotic stresses, such as a lack or excess of nutrients, upregulate the expression of genes related to the biosynthesis of phenolic compounds and activate antioxidant defense mechanisms (HASANUZZAMAN et al., 2020). The oxidative stress in thyme was determined from the following spectrophotometric measurements: TAC, by the formation of the green phosphomolybdenum complex (PRIETO et al., 1999); ORAC, with fluorescein as described by CAO et al. (1993); DPPH free radical scavenging activity (SOLER-RIVAS et al., 2000); and quantification of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method (SINGLETON et al., 1999). The plant extracts (50 mg of dry leaves/mL) were prepared by sonication at 50 Hz ( $2 \times 15$  min) in 50% hydroethanolic solution. The samples were centrifuged (6000 rpm  $\times$  10 min), and the supernatants were pooled and frozen at  $-4$  °C until analysis. The result of the TAC assay is expressed in mg of ascorbic acid equivalents/g of dry leaf (mg AAE/g). The ORAC values were calculated using the regression equation between the Trolox concentration and the net area under the curve (AUC), according to CAO et al. (1993), and are expressed in mol Trolox/g of dry leaf. The results of the DPPH free radical scavenging assay are expressed as the antioxidant activity index (AAI) proposed by SCHERER; GODOY (2009), where the plant extract is considered to have weak antioxidant activity ( $AAI \leq 0.5$ ), moderate antioxidant activity ( $0.5 \leq AAI \leq 1.0$ ), strong antioxidant activity ( $1.0 \leq AAI \leq 2.0$ ), or very strong antioxidant activity ( $AAI \geq 2.0$ ). The total polyphenol content is expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE) per g of leaf dry weight (mg GAE g<sup>-1</sup>).

## 2.5 Distillation and chemical analysis of essential oil

The essential oil was distilled in a Clevenger apparatus modified according to SILVA et al. (2018), with minor modifications. In short, 15 g of dry leaves were hydrodistilled in 1000 mL of distilled water for 90 min. The essential oil was separated from the hydrolate by liquid–liquid partitioning with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( $3 \times 5$  mL) and then dehydrated with 5 g Epsom salt (MgSO<sub>4</sub>). The essential oil was weighed and stored under refrigeration at 4 °C in amber vials until analysis. The essential oil content (%) represents the weight of the oil mg/100 mg of leaf dry weight, and the essential oil yield is expressed in mg/plant.

The chemical analyses by gas chromatography were performed according to BIBIANO et al. (2019), with minor modifications. The modifications were in the injector and detector temperatures of 220 °C and 250 °C, respectively; in the sample split ratio of 50:1; and in the oven conditions, where the initial temperature was held at 60 °C for 1.5 min, followed by a

temperature ramp of 3 °C min<sup>-1</sup> to 100 °C, a temperature ramp of 4 °C min<sup>-1</sup> to 200 °C, and a ramp of 10 °C min<sup>-1</sup> to 240 °C. The other conditions and the analysis of the results followed BIBIANO et al. (2019), including the analyte concentrations, which are expressed as the mean percentage of the normalized relative area for the chromatographic peaks  $\pm$  the standard deviation. The analyses were performed in triplicate ( $n = 3$ ).

## 2.6 Statistical analysis

The data were analyzed using the Hartley, Jarque-Bera (Jarque-Bera, 1980), and generalized extreme Studentized deviate tests (Rosner, 1983) to evaluate the conditions of homogeneity of variances, normality of residuals, and presence of outliers, respectively. Among all variables, only leaf dry weight did not meet the normality criterion, so it was necessary to log-transform the values. Then, the data were analyzed by analysis of variance, and the effects of the dose on the plant biomass variables were evaluated by regression analysis. The data for which significance was suggested were subjected to the Scott-Knott test at 5% probability. The statistical analyses were performed in SISVAR 5.3 statistical software (Ferreira, 2011). Statistica®, version 13.3 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) was used for principal component analysis (PCA).

## 3 Results and discussion

### 3.1 Effects on vegetative growth

The vegetative growth parameters were significantly influenced by the source and dose of manure (Figure 1). The regression analysis identified that, mostly, the plants presented quadratic and linear responses to the manure doses in the vegetative growth variables. Quail and cattle manure resulted in higher dry weight accumulation than goat manure. The response in dry weight gain was faster with quail manure, providing a faster growth, with the use of lesser quantity (Ex: the production of LDW and SDW in the dose of 8 kg m<sup>-2</sup>). However, the highest accumulation of dry weight was observed at the highest doses of cattle manure and quail. The maximum values estimated using equations from the regression curve identified doses that revolve around 10 kg m<sup>-2</sup> for quail manure and 18 kg m<sup>-2</sup> for cattle manure. The production potential of thyme fertilized with goat manure was clearly lower than that of thyme fertilized quail and cattle, and in some variables, there was a difference of more than 120% between them. The results suggest that quail manure requires lower doses for better performance of thyme plants.

The chemical fertilization used is that recommended to meet the nutritional demand of most plant species grown in pot conditions (Malavolta et al. 1997). In general, fertilization with quail and cattle manure at its highest doses provided a higher dry weight gain than chemical fertilization (Figure 1). For leaf dry weight, the highest doses of quail and cattle manure had statistically similar effects as chemical fertilization; however, at the dose of 8 kg m<sup>-2</sup>, quail manure reached a dry weight gain equivalent to that of chemical fertilization. For stem dry weight and total dry weight, starting at a dose of 8 kg m<sup>-2</sup> of quail and cattle manure, the dry weight gains were higher than those of chemical fertilization (Figure 1). The doses of goat manure did not reach a dry weight gain proportional to that achieved by chemical fertilization. For root dry weight, the treatment with chemical fertilization was only superior to the control (0 kg m<sup>-2</sup>) and the doses of 2 and 4 kg m<sup>-2</sup> goat manure.

The chemical analyses indicated that quail manure contained higher levels of most nutrients, especially macronutrients, which may explain the good performance of quail manure in terms of dry weight gain. In addition, the dry weight gain with organic fertilization may be related to its improvement of the soil physical structure, its greater water-holding capacity, its promotion of biological balance, and the good environmental conditions for the development of the root system (Bibiano et al., 2019; Fallah et al., 2020). Beneficial effects of organic fertilization on plant growth have been observed by Hendawy et al. (2010), Skubij and Dzida, (2016), Askary et al., (2018), and Dzida et al., (2019). However, no studies have evaluated different sources and doses of manure to determine the best cultivation conditions for this species.

The data from the chemical analyses indicated that the compositions of the organic matter of the different manures may explain the differences in the performance of the plants, as the carbon:nitrogen ratio (C/N) differed between them. When the C/N ratio is low (<20), mineralization is greater than immobilization; when the C/N ratio is average (20 to 30), mineralization and immobilization are balanced; and when the C/N ratio is high (>30), immobilization is greater than mineralization (Novais et al., 2007). Thus, the C/N ratio of quail manure of 8 suggests a faster availability of nutrients, which also explains the faster dry weight gain under this treatment. In turn, the C/N ratio of cattle manure (28) was an average ratio, which begat a balance in the availability of nutrients, thus explaining the positive and likely more efficient response with increasing doses. On the other hand, the high C/N ratio of goat manure (32) explains the lower performance of this treatment due to the lower availability of nutrients.

In the short term, the increase in the dry weight of plants treated with chemical fertilizer can be attributed to the rapid release of nutrients from both macronutrients- and micronutrients during the early stages of growth. Under such conditions, root development will be a lower priority for nutrient acquisition, as observed in root dry weight. In inorganic fertilizers, nutrients such as nitrogen and phosphorus are rapidly available and are naturally lost to the environment. On the other hand, the nutrients of the organic fertilizers are released more slowly and are thus available in the soil solution for longer, thus ensuring a prolonged residual effect (Salehi et al., 2018; Askary et al., 2018; Fallah et al., 2020).

Among the manure sources used in this study, quail and cattle manure had the highest production potential. Bibiano et al. (2019) reported a similar result for *Dysphania ambrosioides* L., but with greater emphasis on poultry manure. Fallah et al. (2020) also observed an increase in the weight gain provided by poultry manure in *Dracocephalum kotschy* Boiss but no significant difference between sheep manure and cattle manure. In that study, the different responses of each species could be explained by the genetic influence and the variations in nutrient content that exist in organic fertilizers from different sources and locations. According to the vast majority of studies, such as Daff (2012) and Prasanth et al. (2014), thyme is a plant with low fertility requirements. However, the present study shows that this species does have a positive response to fertilization, so we recommend evaluating this phytotechnical parameter in high-scale production.

### **3.2 Effects on plant nutrition**

The accumulated nutrients in leaves under organic fertilization significantly more than they did in the control (Table 1). The highest accumulations of N, P, K, Mg, S, Cu, Fe, Mn, and Zn were observed under fertilization with cattle manure at a dose of 12 kg m<sup>-2</sup>. The chemical fertilizer showed higher accumulations of K and Mn, and the quail manure at the dose of 12 kg m<sup>-2</sup> showed the highest amounts of Ca, B, and Fe. The highest nutrient accumulation with cattle manure (12 kg m<sup>-2</sup>) suggested a nutritional balance that stood out from the other treatments. This fertilization condition let the nutritional demand of the plants be more effectively met during the cultivation period, which was probably related to a more balanced availability and storage of nutrients in the soil for longer periods, thus ensuring a prolonged residual effect and a synergism between demand and availability. Fallah et al. (2020) stated that organic fertilizers can provide nutrients, especially micronutrients, such as Zn, Cu, Fe, and Mn, at optimal levels and in forms more easily assimilated by plants.

The increase in Ca accumulation with quail manure is justified by the chemical analysis of this manure. The positive correlation of Ca accumulation with B was evident in all treatments. This can be explained by the functions of B in the stabilization of cell wall components that depend on the joint action of Ca. Boron acts in the biosynthesis of the cell wall by assisting calcium in the deposition and formation of dimers of pectic polysaccharides (Turan et al., 2018). In this sense, we can assume that the accumulation of Ca in thyme plants requires an adequate supply of B or is conditioned to it. This is a good topic for future studies, since the literature diverges on the relationship between Ca and B (Kanwal et al., 2008; Barker; Pilbeam, 2015; Turan et al., 2018).

Nutrient accumulation was significantly higher with quail or cattle manure (Table 1). When the mean value for the doses was considered, it was evident that as the manure dose increased, there was a significant nutritional gain in all nutrients (Table 1). These results complement the dry weight accumulation, which showed a synergism between the nutritional status and the dry weight gain provided by the different sources and doses of manure.

Variations in nutrient uptake by crops may be related to the supply of these nutrients during the vegetative growth of plants, which may be related to the application of different inorganic and organic sources of nutrients (Bistgani et al., 2018). The availability of all nutrients supplied by organic fertilizers, in addition to other organic molecules, can also play a key role as cofactors, activating metal–ligand enzyme complexes, which facilitate the absorption of nutrients from the soil solution (Pandey et al., 2015; Dzida et al., 2019).

### **3.3 Effects on photosynthetic pigments**

The amount of each photosynthetic pigment present depended on the fertilization source and dose (Table 2). In general, goat manure had the highest mean values of all photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll, and carotenoids), and quail manure showed the lowest mean values of all photosynthetic pigments. Regarding the mean value for the doses, the control (0 kg m<sup>-2</sup>) showed the highest mean values of all photosynthetic pigments except for chlorophyll *a*, which showed a reverse trend and had the highest mean at 12 kg m<sup>-2</sup>.

The chlorophyll content was significantly higher with 12 kg m<sup>-2</sup> of quail or cattle manure, 8 kg m<sup>-2</sup> goat manure, or chemical fertilizers. Chlorophyll *b* was higher in the control and with goat manure at doses of 2 and 8 kg m<sup>-2</sup>. Total chlorophyll was higher with 8 kg m<sup>-2</sup> goat manure and chemical fertilizer. The carotenoid content tended to decrease with increasing doses of quail and cattle manure, so the plants had the lowest carotenoid content at doses of 4, 8, and 12 kg m<sup>-2</sup> quail manure and at doses of 8 and 12 kg m<sup>-2</sup> cattle manure.

Photosynthetic pigments, especially chlorophyll, play key roles in determining the intensity of photosynthesis and dry matter production (Taiz et al., 2017). The results presented herein indicate that thyme plants exposed to a less favorable fertilization condition had more photosynthetic pigments as a physiological response. Zrig et al. (2020), working with thyme under salt stress conditions and under different light conditions, found a marked increase in chlorophyll content, especially chlorophyll *b*, in leaves of plants stressed with NaCl for a longer time and at a stress level that did not cause plant death (50 mM), showing that thyme can maximize its light-harvesting capacity in response to stress. Through a simple calculation, multiplying the chlorophyll content of the treatments ( $\text{mg g}^{-1}$ ) by the leaf dry weight (g), it was observed that the accumulation of chlorophyll in thyme varied widely. Comparing the control treatments ( $0 \text{ kg m}^{-2}$ ) and  $12 \text{ kg m}^{-2}$  cattle or quail manure, the difference was up to 181% greater in the treatments with fertilization.

Carotenoids are known to play an important role in photoprotection (Taiz et al., 2017). The increase in carotenoid content in the control and at the lower fertilization doses indicates a greater need for the carotenoid photoprotection process. Zrig et al. (2020) found that thyme plants exposed to salt stress, both for a shorter time (2 weeks) and for a longer time (4 weeks), had higher carotenoid content and antioxidant activity, showing the potential of this pigment to eliminate accumulated reactive oxygen species. In this sense, nutritional deficiency can increase the deleterious effects of oxidative stress in plants and act as an induction condition to improve the antioxidant capacity and increase the synthesis of protective compounds such as carotenoids.

### **3.4 Effect on oxidative stress**

Cellular redox homeostasis in plants is affected by abiotic factors that can cause elevations in reactive oxygen species (ROS), significantly modulating survival, reproduction, and agricultural productivity (Anjum et al., 2016). Nonenzymatic antioxidants such as carotenoids and total phenols play important roles in reducing oxidative stress and regulating the cellular homeostasis of ROS in plants (Sarker; Oba, 2020). In addition to the measurement of nonenzymatic antioxidants, assays that quantify the antioxidant activity/capacity of a plant material are useful to express the amounts of free radicals that can be eliminated by an antioxidant (Mareček et al., 2016).

Thyme plants exhibited oxidative stress responses that depended on the source and dose of fertilization (Table 2). In general, the plants fertilized with goat manure showed the highest stress levels because they had the highest concentrations of carotenoids and total phenols,

regardless of the dose applied. Considering the overall mean of each manure source, the total phenolic content was significantly higher in goat manure (70.31 mg GAE g<sup>-1</sup>) and lower in quail manure (53.53 mg GAE g<sup>-1</sup>). Comparing the mean values of the different doses, the highest doses tended to increase the total phenolic content, while the lowest tended to decrease the carotenoid content. The highest total phenolic content was observed in the treatment with 8 kg m<sup>-2</sup> goat manure (73.06 mg GAE g<sup>-1</sup>), and the lowest were observed with 2 and 4 kg m<sup>-2</sup> quail manure (51.72 and 52.08 mg GAE g<sup>-1</sup>, respectively) and chemical fertilizer (51.84 mg GAE g<sup>-1</sup>) (Table 2).

Phenolic compounds have direct antioxidant action and constitute the main class of natural antioxidants present in thyme (Mancini et al., 2015). The total phenolic content we found in *T. vulgaris* is in agreement with those reported for species of the genus *Thymus*, which range from 13 to 141 mg GAE g<sup>-1</sup> (Gedikoğlu et al., 2019). According to Mancini et al. (2015), the variation in total phenolic content in thyme may be due to environmental conditions such as soil fertility. This corroborates the results of the present study, since fertilization was a determinant factor in the variations in the content of these compounds. The higher levels of total phenolics observed in plants fertilized with goat manure suggest that these plants were under stress conditions, possibly caused by the limited availability of nutrients to the plants (Table 1).

The measurements of antioxidant activity by TAC, ORAC, and DPPH free radical scavenging activity statistically bigger responses in the plants without fertilization (control). These results showed the need for fertilization in thyme crops, also indicating that carotenoids seem to actively participate in the redox balance of the plant (Table 2).

The lowest stress levels indicated by the TAC assay were observed in plants treated with 2 and 4 kg m<sup>-2</sup> quail manure (57.71 and 59.16 mg AAE g<sup>-1</sup>, respectively). Among the means of the manure sources and doses, the source that provided the lowest TAC was quail manure (61.26 mg AAE g<sup>-1</sup>), and the doses that provided the lowest TAC were 2 and 4 kg m<sup>-2</sup> (64.24 and 64.50 mg AAE g<sup>-1</sup>, respectively). The lowest levels of antioxidant activity (AAI in DPPH assay) were observed in all treatments that used quail manure as a source (0.78 - 0.82) and cattle manure at doses of 4 and 8 kg m<sup>-2</sup> (0.77 and 0.85, respectively). The AAIs from the DPPH assay showed that the control had high antioxidant activity and the other treatments had moderate antioxidant activity. In the ORAC assay, the results showed that the treatments with 12 kg m<sup>-2</sup> cattle manure and 4 kg m<sup>-2</sup> goat manure had the lowest oxidative stress conditions, since the lowest oxidation inhibition was observed (1.35 µmol ET mg<sup>-1</sup> and 1.41 µmol ET mg<sup>-1</sup>, respectively). On the other hand, no significant differences were found between manure

sources. As mentioned above, the highest inhibition of oxidation was observed in the control treatment ( $1.84 \mu\text{mol ET mg}^{-1}$ ).

The divergent responses between the assays are related to the type of reaction involved in each assay. Considering the chemical reactions involved, the assays for measuring antioxidant activity/capacity can be classified as hydrogen atom transfer (HAT)-based, electron transfer (ET)-based, and mixed-mode (ET- and HAT-based) assays. Thus, methods for measuring antioxidant activity, such as oxygen radical absorption capacity (ORAC), are usually competitive HAT-based assays, while antioxidant capacity assays, such as those that measure TAC and DPPH free radical scavenging, are generally noncompetitive and use single electron transfer (SET) or mixed-mode mechanisms (SET/HAT) (Apak et al., 2017). It should also be noted that the ORAC assay is limited to measuring the antioxidant activity of the breakdown of hydrophilic chains only against peroxy radicals. It ignores lipophilic antioxidants that are particularly important against lipid oxidation in all systems, as well as other radicals ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{HOO}\cdot$ ,  $\text{ONOO}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$ , etc.) that are also physiologically reactive (Prior et al., 2005).

### 3.5 Effects on the production and chemical composition of essential oil

The content ( $\text{mg}/100 \text{ mg}$  leaf dry weight) and yield ( $\text{mg plant}^{-1}$ ) of the essential oil of thyme were significantly affected by fertilization (Table 2). Regardless of the type of organic fertilizer, the dose of  $12 \text{ kg m}^{-2}$  showed maximum levels (1.09 to 1.26%), as did the dose of  $8 \text{ kg m}^{-2}$  in plants fertilized with cattle manure (1.21%) or goat manure (1.14%). The hydrodistilled essential oil content found in the present study is in accordance with the range of 0.3 to 4.0% reported in the literature for this species (Hendawy et al., 2010; Pirbalouti et al., 2013; Pavela et al., 2018; Gedikoğlu et al., 2019).

The best essential oil yield was observed with  $12 \text{ kg m}^{-2}$  cattle manure ( $77.06 \text{ mg plant}^{-1}$ ), and the lowest yield was observed in the control ( $9.52 \text{ mg plant}^{-1}$ ) and at doses of 2 and  $4 \text{ kg m}^{-2}$  of organic fertilizers. The linear increase in the doses of organic manures brought increases in essential oil yield that reached 710%, as seen in the comparison between the control treatments and  $12 \text{ kg m}^{-2}$  of cattle manure. The overall analysis confirms the above data by indicating that plants grown with higher doses of cattle manure had the highest contents and yields of essential oils (Table 2).

In plants fertilized with chemical fertilizer (1.23%), a high essential oil content was also observed, reinforcing that the cultivation of thyme is demanding in terms of fertilization. The greater availability and accumulation of nutrients in fertilized plants favored both vegetative growth and essential oil production. Noroozisharaf and Kaviani (2018) and Bistgani et al.



(2018) reported that the availability of nutrients under fertilizer application significantly increased the number of glandular trichomes in essential oil-producing plants. Key nutrients such as N, P, and K promote the development and division of cells, thereby increasing the density of glandular trichomes (Bistgani et al., 2018).

Chemical analysis of the essential oil of thyme leaves indicated the presence of 17 to 19 chemical constituents, which comprised 95.1 to 98.2% of the total chemical composition (Table 3). Thymol (53.1 - 62.2%) is the major component of this thyme oil, followed by the predominance of  $\rho$ -cymene (12.7 - 19.1%) and  $\gamma$ -terpinene (3.66 - 6.73%). These levels are in agreement with those reported in the literature for these monoterpenes in *T. vulgaris* (10-74% thymol; 7-56%  $\rho$ -cymene, and 1.4-31%  $\gamma$ -terpinene) (Burt, 2004; Hendawy et al., 2010; Noroozisharaf; Kaviani, 2018). According to the chemotype classification of Satyal et al. (2016), thyme in the present study belongs to the thymol chemotype due to the predominance of thymol and  $\rho$ -cymene.

As observed for the essential oil content and yield, the thymol content was highest in plants fertilized with 12 kg m<sup>-2</sup> cattle manure (62.2%). The plants treated with chemical fertilizer had the second-highest absolute thymol content, and interestingly, the plants fertilized with 12 kg m<sup>-2</sup> cattle manure had the lowest  $\rho$ -cymene levels (11.6 and 12.7%, respectively). However, plants under chemical fertilization had the highest  $\gamma$ -terpinene content (6.73%), while those fertilized with 12 kg m<sup>-2</sup> cattle manure had the lowest proportion of  $\gamma$ -terpinene (4.67%). Also noteworthy was that in plants with lower levels of thymol, higher levels of  $\rho$ -cymene were observed, as in the treatment with 4 kg m<sup>-2</sup> quail manure.

Several monoterpene synthases are involved in the transcription of monoterpene genes in plants of the family Lamiaceae. Given the importance of the regulation of terpene synthase in these species, the overexpression or suppression of catalysts is a direct way to change the concentrations of their chemical components, as demonstrated by Crocoll et al. (2010). Both  $\gamma$ -terpinene and  $\rho$ -cymene are biosynthetic precursors of thymol (Polouse; Croteau, 1978; Crocoll et al., 2010). The conversion of  $\gamma$ -terpinene into thymol can proceed via  $\rho$ -cymene or by the spontaneous conversion of  $\gamma$ -terpinene into  $\rho$ -cymene (Granger et al., 1964; Polouse; Croteau, 1978). In *Origanum vulgare* L. plants,  $\gamma$ -terpinene is a biosynthetic precursor of thymol, since kinetic studies of monoterpene synthases performed by Crocoll et al. (2010) indicated that among the bivalent ionic cofactors Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, the Mn<sup>2+</sup> ion increased the enzyme affinity for the substrate, and the maximum rate of reaction it stimulated was 2.3-fold that of the Mg<sup>2+</sup> ion. This explains the higher concentration of  $\gamma$ -terpinene in thyme plants fertilized with chemical fertilizer, which contained the highest Mn and minimum Mg contents (Table 1). The

plants fertilized with 12 kg m<sup>-2</sup> cattle manure also showed Mn levels statistically equivalent to those obtained with chemical fertilization; however, their Mg concentration was highest, which may have led the competition of these cofactors to favor the synthesis of  $\rho$ -cymene.

In addition to these qualitative differences,  $\alpha$ -thujene,  $\alpha$ -terpinene, and thymol acetate were detected in some treatments but not others, as shown in Table 3. Therefore, the quantity and quality of nutrients present in the different fertilizers were reflected not only in the phytotechnical and physiological aspects but also in how they significantly affected the qualitative-quantitative parameters of the essential oil.

### 3.6 Principal component analysis

Principal component analysis (PCA) was applied to evaluate the interactions between the variables and the types of fertilization to comprehensively understand the magnitudes of the effects of the various data components. The PCA in Figure 2 shows the matrix correlation of the macronutrients- and micronutrient content, essential oil content, photosynthetic pigments, and total dry weight variables, explaining 82.71% of the total variation. The separation between PC1 and PC2 left each type of manure and the control in different quadrants of the plot. In addition, the relationships between nutritional variables and the accumulation of total dry matter and the amounts of total chlorophyll, carotenoids, and essential oil are noteworthy. More specifically, the essential oil content showed positive correlations with the levels of N and Mg; TDW accumulation was directly correlated with B content; the total chlorophyll content with K; and the carotenoid concentration with P and Zn.

This analysis highlights the importance of nutritional quality to thyme plants. N is an important nutrient for essential oil production due to the key function of this nutrient as a constituent of several plant cellular components, including chlorophyll, amino acids, and nucleic acids. Thus, it plays an essential role in cell development and division, such as in the increase in the density and/or volume of anatomical structures responsible for the synthesis and accumulation of essential oils (Bistgani et al., 2018). On the other hand, Mg is important for the activation of enzymes involved in respiration, photosynthesis, DNA and RNA synthesis, phosphorus transporter, nutrient absorption, synthesis of macromolecules (carbohydrates, lipids, proteins), ion absorption, translocation of starch, and, in particular, in the activity of terpene synthase (Roemheld; Kirkby, 2007; Crocoll et al., 2010). Thus, Mg participates in a series of vital plant processes that provide energy and are directly involved in plant metabolism. Khalid et al. (2009) found that the application of Mg either to the soil or to the leaves

progressively increased the essential oil production of thyme plants compared to the control, corroborating the important role of this nutrient in the production of essential oil.

The K present in plants, as in its cationic form ( $K^+$ ), plays a key role in photosynthesis, regulating the opening and closing of stomata and, consequently, the entry of  $CO_2$  into the leaf. In addition, it activates many enzymes involved in respiration and photosynthesis (Faquin; Rhodes, 2015). Thus, an increase in this nutrient suggests an increase in photosynthetic activity in thyme plants, which is reinforced by its positive correlations with chlorophylls (Figure 2). The correlation of Zn with total carotenoids confirms the essential role of this micronutrient in the photosynthetic apparatus of plants. As reported by Zhang et al. (2020), higher Zn concentrations activated carotenoid metabolism in *Nicotiana tabacum* L. leaves. Boron also has several functions in essential physiological processes, including sugar transport, lignification of the cell wall, cell wall structuring, carbohydrate metabolism, RNA metabolism, respiration, indoleacetic acid metabolism, phenol metabolism, membrane function,  $N_2$  fixation, and ascorbate metabolism (Shireen, et al., 2018). In this sense, the dry weight gain of thyme plants correlated with the input of this nutrient is well founded and justified, mainly by its role in cell wall formation.

The PCA in Figure 3 shows the matrix correlation of the variables underlying oxidative stress and the chemical composition of the essential oil. This analysis explained 83.46% of the total variation, where the separation of PC1 and PC2 placed the cattle and quail manure in the same quadrant and the control and goat manure each in separate quadrants. The proximity between cattle and quail manure suggests parity between these manure sources, which corroborates the vegetative growth, nutrition, and essential oil production data. This PCA also identified positive correlations between total phenolic content and the levels of carvacrol and thymol; between antioxidant activity by the ORAC assay and 1,8-cineole; and between the TAC and DPPH assay data and 1-octen-3-ol, besides an inversely proportional correlation with the  $p$ -cymene levels.

The correlation of total phenolics with carvacrol and thymol highlights that these phenolic monoterpenes (thymol and carvacrol) were the main phenols found in thyme samples. On the other hand, the correlation between the ORAC method and 1,8-cineole suggests the contribution of this oxygenated monoterpene as the constituent responsible for the antioxidant activity induced by HAT mechanisms (Apak et al., 2017). This possibility is corroborated by Porres-Martínez et al. (2014), who demonstrated in *Salvia lavandulifolia* Vahl. that the compound with antioxidant activity detected by the ORAC method was 1,8-cineole, with a 30 to 45% reduction in ROS production in this species. On the other hand, the negative correlation

of  $p$ -cymene with antioxidant responses indicates that it does not act through any of the antioxidant mechanisms involved in these assays.  $p$ -Cymene has a range of biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, antinociceptive, anxiolytic, anticancer, and antimicrobial effects (Oliveira et al., 2015; Marchese et al., 2017). Investigations on the antioxidant mechanisms of  $p$ -cymene by Oliveira et al. (2015) demonstrated its ability to increase the activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase and catalase, with a significant reduction in lipid peroxidation and nitrite content. The results reported by Oliveira et al. (2015), therefore, suggest that  $p$ -cymene is involved in the elimination not of ROS but rather of reactive nitrogen species, despite being a biosynthetic precursor of thymol, which has recognized antioxidant activity against ROS.

The synergism of the variables TAC and DPPH with 1-octen-3-ol provides important information that may make these compounds the target of further research. 1-Octen-3-ol serves as a signaling molecule in plant cell responses, plant–herbivore interactions, and plant–plant interactions. For example, in *Arabidopsis*, 1-octen-3-ol induces the expression of defense genes that are normally upregulated by wounds or ethylene/jasmonic acid signaling (Kishimoto et al., 2007). On the other hand, treatment with 1-octen-3-ol resulted in a dramatic reduction in  $H_2O_2$ . In addition, this compound seems to stimulate an explosion of mRNA transcription related to antioxidants, participating in the expression of genes encoding enzymes associated with the intracellular redox state (Chen et al., 2019). Few studies have been conducted with this compound in plants, suggesting a field for future research.

#### 4 Conclusions

*Thyme* plants respond positively to different fertilization conditions, so their adaptations are reflected by changes in their phytotechnical and metabolic characteristics. The direct effect of fertilization on the nutritional status of thyme plants has an immediate effect on vegetative growth, oxidative stress, and the quantitative-qualitative properties of essential oil and phenolic compounds. The level of essential oil production in *T. vulgaris* plants is responsive to and dependent on the increase in manure dose, as well as the type of manure. Among the manure sources used, quail and cattle manure were the most effective for the cultivation of thyme, adding value both for production aimed at condiments (leaf dry weight) and essential oil (essential oil yield). Doses between 8 and 12 kg m<sup>-2</sup> of quail and cattle manure were safe and potentiated the thyme plant production and essential oil yield.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the Universidade Federal de Lavras (UFLA) for all its support in terms of structure and resources, as well as the funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

## References

- Akbar, S. (2020). *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae). In Handbook of 200 Medicinal Plants (pp. 1795-1810). Springer, Cham.
- Amooaghaie, R., & Golmohammadi, S. (2017). Effect of vermicompost on growth, essential oil, and health of *Thymus vulgaris*. *Compost Science & Utilization*, 25(3), 166-177.
- Anjum, N. A., Khan, N. A., Sofu, A., Baier, M., & Kizek, R. (2016). Redox homeostasis managers in plants under environmental stresses. *Frontiers in Environmental Science*, 4:35, 4p.
- Apak, R., Capanoglu, E., & Shahidi, F. (Eds.). (2017). *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*. John Wiley & Sons.
- Asha, D. and Lizzy, M. (2017) Chemical Profiling of *Thymus vulgaris* L. Using HPTLC. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* , 6, 1017-1023.
- Askary, M., Behdani, M. A., Parsa, S., Mahmoodi, S., & Jamialahmadi, M. (2018). Water stress and manure application affect the quantity and quality of essential oil of *Thymus daenensis* and *Thymus vulgaris*. *Industrial Crops and Products*, 111, 336-344.
- Assis, R. M. A., Carneiro, J. J., Medeiros, A. P. R., de Carvalho, A. A., Honorato, C. A., Carneiro, M. A. C., Bertolucci, S. K. V. & Pinto, J. E. B. P. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic manure enhance growth and accumulation of citral, total phenols, and flavonoids in *Melissa officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 158, 112981.
- Barker, A. V., & Pilbeam, D. J. (2015). *Handbook of plant nutrition*. CRC press.

- Barnes, J. D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., & Davison, A. W. (1992). A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 32(2), 85–100. doi:10.1016/0098-8472(92)90034-y
- Bibiano, C.S., de Carvalho, A.A., Bertolucci, S.K.V., Torres, S.S., Correa, R.M., Pinto, J.E.B.P., 2019. Organic manure sources play fundamental roles in growth and qualitative production of essential oil from *Dysphania ambrosioides* L. *Ind. Crop. Prod.* 139, 111512.
- Bistgani, Z. E., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A., Pirbalouti, A. G., Hashemi, M., Maggi, F., & Morshedloo, M. R. (2018). Application of combined fertilizers improves biomass, essential oil yield, aroma profile, and antioxidant properties of *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 121, 434-440.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Calin-Sanchez, A., Figiel, A., Lech, K., Szumny, A., Carbonell-Barrachina, A.A., 2013. Effects of drying methods on the composition of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil. *Drying Technol.* 31, 224–235.
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free radical biology and medicine*, 14(3), 303-311.
- CBI - Centre for the Promotion of Imports from developing countries - The European market potential for dried thyme (2020). CBI, 1-10.
- Chen, H., Yang, R., Chen, J., Luo, Q., Cui, X., Yan, X., & Gerwick, W. H. (2019). 1-Octen-3-ol, a self-stimulating oxylipin messenger, can prime and induce defense of marine alga. *BMC plant biology*, 19(1), 37.
- Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J., & Degenhardt, J. (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant molecular biology*, 73(6), 587-603.
- DAFF (Department of Agriculture, Forestry & Fisheries). Production guidelines for thyme: Thyme production. Directorate Communication Services: Plant Production. Pretoria, South Africa, 25p., 2012.

- Dzida, K., Michałojć, Z., Jarosz, Z., Pitura, K., Skubij, N., Skubij, D., Krawiec, M. (2019). Effect of natural fertilization and calcium carbonate on yielding and biological value of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 18(5), 105–112. DOI: 10.24326/asphc.2019.5.10
- El Ansari, Z. N., El Mihaoui, A., Boussaoudi, I., Benkaddour, R., Hamdoun, O., Tahiri, H., ... & Lamarti, A. (2019). Effect of Macronutrients, Cytokinins and Auxins, on in Vitro Organogenesis of *Thymus vulgaris* L. *American Journal of Plant Sciences*, 10(09), 1482.
- Fallah, S., Mouguee, S., Rostaei, M., Adavi, Z., Lorigooini, Z., & Shahbazi, E. (2020). Productivity and essential oil quality of *Dracocephalum kotschyi* under organic and chemical fertilization conditions. *Journal of Cleaner Production*, 255, 120189.
- Faquin, V., Rodas, C. L. (2015). *Funções dos nutrientes nas plantas: guia de estudos*. Lavras-MG : UFLA, p.135.
- Fayad, N.K., Al-Obaidi, O.H.S., Al-Noor, T.H. and Ezzat, M.O. (2013) Water And Alcohol Extraction Of Thyme Plant (*Thymus vulgaris*) and Activity Study Against Bacteria, Tumors And Used as Anti-Oxidant in Margarine Manufacture. *Innovative Systems Design and Engineering*, 4, 41-51.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042.
- Gedikoğlu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. (2019). Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food science & nutrition*, 7(5), 1704-1714.
- Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M.B.; Zulfiqar, F.; Raza, A.; Mohsin, S.M.; Mahmud, J.A.; Fujita, M.; Fotopoulos, V. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants* 2020, 9, 681.
- Hendawy, S. F., Ezz El-Din, A. A., Aziz, E. E., & Omer, E. A. (2010). Productivity and oil quality of *Thymus vulgaris* L. under organic fertilization conditions. *Ozean J. Appl. Sci*, 3(2), 203-216.
- Hiscox, J.D., And Israelstam, G.F. (1979). A method for the extraction of chloro- phyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57(12): 1332–1334. doi:10.1139/b79-163.

- Hosseinzadeh, S., Kukhdan, A. J., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of *Thymus vulgaris* in traditional and modern medicine: a review. *Global J Pharmacol*, 9, 260-6.
- Jarque, C. M., & Bera, A. K. (1980). Efficient tests for normality, homoscedasticity and serial independence of regression residuals. *Economics letters*, 6(3), 255-259.
- Kanwal, S., Rahmatullah, Aziz, T., Maqsood, M. A., & Abbas, N. (2008). Critical ratio of calcium and boron in maize shoot for optimum growth. *Journal of Plant Nutrition*, 31(9), 1535-1542.
- Khalid, A. K., Zaghoul, S. M., & Yassen, A. A. (2009). Responses of thyme (*Thymus vulgaris* L.) to magnesium application. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 52-57.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2007). Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*, 73(1), 35-37.
- Mahdavi, A., Moradi, P., & Mastinu, A. (2020). Variation in Terpene Profiles of *Thymus vulgaris* in Water Deficit Stress Response. *Molecules*, 25(5), 1091.
- Malavolta, E. (1981). *Manual de química agrícola: adubos e adubação*. Editora Agronômica Ceres, 596.
- Mancini, E., Senatore, F., Del Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M., ... & De Feo, V. (2015). Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules*, 20(7), 12016-12028.
- Marchese, A., Arciola, C. R., Barbieri, R., Silva, A. S., Nabavi, S. F., Tsetegho Sokeng, A. J., ... & Nabavi, S. M. (2017). Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene. *Materials*, 10(8), 947.
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., & Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of cereal science*, 73, 40-45.
- Noroozisharaf, A., & Kaviani, M. (2018). Effect of soil application of humic acid on nutrients uptake, essential oil and chemical compositions of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.)



under greenhouse conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(3), 423-431.

Novais, R. F.; et al. (Ed.) *Fertilidade do Solo*. Viçosa: SBCS, 2007.

Oliveira, T. M., de Carvalho, R. B. F., da Costa, I. H. F., de Oliveira, G. A. L., de Souza, A. A., de Lima, S. G., & de Freitas, R. M. (2015). Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. *Pharmaceutical biology*, 53(3), 423-428.

Pandey, V., Patel, A., & Patra, D. D. (2015). Amelioration of mineral nutrition, productivity, antioxidant activity and aroma profile in marigold (*Tagetes minuta* L.) with organic and chemical fertilization. *Industrial Crops and Products*, 76, 378-385.

Pavela, R., Žabka, M., Vrchotová, N., & Tríska, J. (2018). Effect of foliar nutrition on the essential oil yield of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Industrial crops and products*, 112, 762-765.

Pirbalouti, A. G., Hashemi, M., & Ghahfarokhi, F. T. (2013). Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 48, 43-48.

Porres-Martínez, M., González-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2015). Major selected monoterpenes  $\alpha$ -pinene and 1, 8-cineole found in *Salvia lavandulifolia* (Spanish sage) essential oil as regulators of cellular redox balance. *Pharmaceutical Biology*, 53(6), 921-929.

Poulose, A. J., & Croteau, R. (1978). Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of  $\gamma$ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 187(2), 307-314.

Poulose, A. J., & Croteau, R. (1978). Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of  $\gamma$ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 187(2), 307-314.

Prasanth Reddy, V., Ravi Vital, K., Varsha, P. V., & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med Aromat Plants*, 3(164), 2167-0412.

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application

to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.  
10.1006/abio.1999.4019

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.

Roemheld, V. and E.A. Kirkby (2007). Magnesium functions in crop nutrition and yield. The International Fertilizer Society. Proceedings No. 616, York, UK, 24 pp.

Rosner, B. (1983). Percentage points for a generalized ESD many-outlier procedure. *Technometrics*, 25(2), 165-172.

Salehi, A., Mehdi, B., Fallah, S., Kaul, H.P., Neugschwandtner, R.W., 2018. Productivity and nutrient use efficiency with integrated fertilization of buckwheatfenugreek intercrops. *Nutrient Cycl. Agroecosyst.* 110 (3), 407-425.

Santos, R. P., Da Cruz, A. C. F., Iarema, L., Kuki, K. N., & Otoni, W. C. (2008). Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. *Ceres*, 55 (4), 356-364.

Sarker, U.; Oba, S. (2020) The Response of Salinity Stress-Induced *A. tricolor* to Growth, Anatomy, Physiology, Non-Enzymatic and Enzymatic Antioxidants. *Front. Plant Sci.* 11:559876.

Satyal, P., Murray, B. L., McFeeters, R. L., & Setzer, W. N. (2016). Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*, 5(4), 70.

Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.

Shireen, F., Nawaz, M. A., Chen, C., Zhang, Q., Zheng, Z., Sohail, H., ... & Bie, Z. (2018). Boron: functions and approaches to enhance its availability in plants for sustainable agriculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1856.

Silva, T.C.; Pinto, J.E.B.P. ; Pacheco, F.V.; Roza, H.L.H.; Lordêllo , D.M.S.; Bertolucci, S.K.V. (2018).The growth, photosynthetic pigments and essential oil composition of monocropped and intercropped lemon balm with yarrow. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 40, e35506, 2018.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*. Academic Press, 299, 152-178.
- Skubij, N., & Dzida, K. (2016). Effect of natural fertilization and the type of substrate on the biological value of the thyme herb (*Thymus vulgaris* L.). *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 15(6), 291-304.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., & Wichers, H. J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 11(5), 330-338.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. Editora Artmed, 6ª edição.
- Thompson, J. D., Chalchat, J. C., Michet, A., Linhart, Y. B., & Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of chemical ecology*, 29(4), 859-880.
- Tisserand, R., & Young, R. (2014). *Essential oil safety-e-book: A guide for health care professionals*. Elsevier Health Sciences.
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 220, 153-161.
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Trindade, H. (2019). Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. *Industrial Crops and Products*, 134, 89-99.
- Turan, M. A., Taban, S., Kayin, G. B., & Taban, N. (2018) Effect of boron application on calcium and boron concentrations in cell wall of durum (*Triticum durum*) and bread (*Triticum aestivum*) wheat, *Journal of Plant Nutrition*, 41:11, 1351-1357, DOI: 10.1080/01904167.2018.1450424
- Wellburn, A. R. (1994). 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*, 144(3), 307-313.

- Zandvakili, O. R., Ebrahimi, E., Hashemi, M., Barker, A. V., & Akbari, P. (2017). The potential of green manure mixtures to provide nutrients to a subsequent lettuce crop. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 48(19), 2246-2255.
- Zhang, H., Xu, Z., Guo, K., Huo, Y., He, G., Sun, H., ... & Sun, G. (2020). Toxic effects of heavy metal Cd and Zn on chlorophyll, carotenoid metabolism and photosynthetic function in tobacco leaves revealed by physiological and proteomics analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110856.
- Zrig, A., Tounekti, T., AbdElgawad, H., Hamouda, F., & Khemira, H. (2020). Influence of light intensity and salinity on growth and antioxidant machinery of *Thymus vulgaris* L. *Indian Journal of Experimental Biology*, 58, 323-335.

Table 1. Nutrient accumulation in dry leaves of *Thymus vulgaris* grown with different types of fertilization.

Manures	Dose Kg m <sup>-2</sup>	N	P	Ca	K	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
		mg planta <sup>-1</sup>										
Control	0	024.35 k	04.35 k	025.88 k	27.29 d	05.22 l	05.00 j	0.0718 j	0.0328 l	0.0053 g	0.3159 d	0.1313 g
	2	077.39 h	11.93 f	098.19 g	66.82 c	15.34 i	13.64 g	0.2768 f	0.0856 h	0.0128 d	0.4695 c	0.1766 f
	4	101.93 f	14.25 e	119.64 e	85.08 a	19.87 f	16.41 f	0.2924 f	0.1045 f	0.0159 c	0.8409 b	0.2103 e
	8	136.79 c	21.45 c	182.00 b	78.83 b	33.62 c	27.24 c	0.4892 b	0.1478 c	0.0223 a	0.7645 b	0.2574 d
	12	149.09 b	23.22 b	199.81 a	72.10 b	39.11 b	31.16 b	0.5249 a	0.1656 b	0.0230 a	0.7882 b	0.2719 d
Cattle	2	062.74 i	09.91 i	068.58 i	72.39 b	14.48 j	12.70 h	0.1999 h	0.0721 j	0.0116 d	0.5144 c	0.1887 f
	4	083.57 g	12.30 f	086.10 h	77.06 b	18.09 g	15.56 f	0.2569 g	0.0919 g	0.0173 c	0.6031 c	0.2192 e
	8	129.02 d	18.71 d	113.19 f	93.05 a	30.70 d	24.46 d	0.3429 e	0.1233 e	0.0182 b	0.7218 b	0.4101 b
	12	181.93 a	26.86 a	145.30 c	90.35 a	48.23 a	37.24 a	0.4316 c	0.1716 a	0.0232 a	1.0684 a	0.5659 a
	2	049.60 j	08.04 j	044.62 j	66.83 c	10.34 k	09.19 i	0.1465 i	0.0513 k	0.0094 e	0.2603 d	0.1413 g
Goat	4	071.57 h	10.65 h	069.39 i	74.85 b	14.21 j	12.02 h	0.2172 h	0.0699 j	0.0107 e	0.3699 d	0.1940 f
	8	089.22 g	11.00 h	067.83 i	77.61 b	16.50 h	13.14 g	0.2142 h	0.0788 i	0.0104 e	0.3401 d	0.2793 d
	12	108.58 e	11.48 g	068.23 i	65.93 c	17.71 g	14.11 g	0.2050 h	0.072.8 j	0.0084 f	0.3028 d	0.2329 e
Chemical		154.32 b	18.59 d	126.72 d	94.05 a	21.40 e	19.15 e	0.3655 d	0.1374 d	0.0196 b	1.0453 a	0.3520 c
Means for manures												
Quail		116.30 a	17.71 a	149.91 a	75.71 b	26.98 b	22.11 a	0.3958 a	0.1259 a	0.0185 a	0.7158 a	0.2291 b
Cattle		114.31 a	16.94 a	103.29 b	83.21 a	27.87 a	22.49 a	0.3078 b	0.1147 a	0.0176 a	0.7269 a	0.3460 a
Goat		079.74 b	10.29 b	062.52 c	71.31 c	14.69 c	12.11 b	0.1957 c	0.0682 b	0.0097 b	0.3182 b	0.2119 b
Means for doses												
0		024.35 d	04.35 c	025.88 b	27.29 c	5.22 c	5.00 c	0.0718 d	32.83 c	0.0053 c	0.3159 b	0.1313 b
2		063.24 c	09.96 b	070.46 b	68.68 b	13.39 b	11.84 b	0.2077 c	0.0697 b	0.0113 b	0.4147 b	0.1689 b
4		085.69 c	12.40 b	091.71 a	79.00 a	17.39 b	14.66 b	0.2555 b	0.0888 b	0.0146 a	0.6046 a	0.2078 b
8		118.34 b	17.05 a	121.01 a	83.16 a	26.94 a	21.61 a	0.3488 a	0.1166 a	0.0170 a	0.6088 a	0.3156 a
12		146.53 a	20.52 a	137.78 a	76.13 a	35.02 a	27.50 a	0.3872 a	0.1367 a	0.0182 a	0.7198 a	0.3569 a

\* Means followed by the same letter in a column do not differ significantly by the Scott-Knott test (5%).

Table 2. Effect of organic and chemical fertilization on photosynthetic pigments, essential oil and oxidative stress of *Thymus vulgaris* leaves.

Manures	Dose	Photosynthetic pigments			Carotenoids	Essential oil			Oxidative stress			
		Chlorophyll				Cont.	Yield	Phenols	TAC	ORAC	DPPH	
		<i>a</i>	<i>B</i>	Total								
	Kg m <sup>-2</sup>		mg g <sup>-1</sup> de matéria fresca		%	mg plant <sup>-1</sup>	mg GAE g <sup>-1</sup>	mg AAE g <sup>-1</sup>	μmol ET mg <sup>-1</sup>	AAI		
Control	0	0.90 d	1.02 a	1.92 b	0.70 a	0.88 c	09.52 h	65.58 c	76.63 a	1.84 a	1.30 a	
	2	0.75 f	0.90 c	1.65 d	0.66 a	0.80 c	27.35 f	51.72 h	57.71 g	1.58 c	0.82 d	
	Quail	4	0.72 f	0.84 c	1.56 d	0.63 b	0.96 b	41.46 d	52.08 h	59.16 g	1.56 c	0.82 d
		8	0.82 e	0.86 c	1.67 d	0.62 b	1.02 b	59.38 c	54.94 g	61.77 f	1.65 b	0.82 d
		12	0.89 d	0.87 c	1.75 c	0.63 b	1.09 a	66.47 b	55.41 g	66.41 e	1.71 a	0.78 d
Cattle	2	0.80 e	0.94 b	1.74 c	0.66 a	1.01 b	25.68 f	59.77 e	66.52 e	1.79 a	0.90 c	
	4	0.80 e	0.93 b	1.74 c	0.66 a	0.93 b	33.69 e	58.25 f	69.11 d	1.62 b	0.77 d	
	8	0.93 c	0.87 c	1.81 c	0.60 b	1.21 a	58.09 c	64.81 d	70.60 c	1.51 c	0.85 d	
	12	1.01 a	0.94 b	1.95 b	0.64 b	1.26 a	77.06 a	64.28 d	74.55 b	1.35 d	0.91 c	
Goat	2	0.86 d	1.02 a	1.88 b	0.70 a	0.85 c	16.30 g	69.57 b	68.49 d	1.60 b	0.95 b	
	4	0.86 d	0.98 b	1.84 c	0.68 a	0.90 c	24.49 f	69.33 b	65.18 e	1.41 d	0.92 c	
	8	1.04 a	1.02 a	2.07 a	0.68 a	1.14 a	34.83 e	73.06 a	71.59 c	1.72 a	1.00 b	
	12	0.99 b	0.98 b	1.97 b	0.65 a	1.16 a	37.98 d	69.27 b	68.99 d	1.64 b	0.93 c	
Chemical		1.08 a	0.95 b	2.03 a	0.67 a	1.23 a	69.46 b	51.84 h	64.88 e	1.76 a	0.90 c	
Means for manures												
	Quail	0.80 b	0.87 c	1.66 c	0.63 b	0.97 b	48.66 a	53.53 c	61.26 b	1.62 a	0.81 b	
	Cattle	0.89 a	0.92 b	1.81 b	0.64 b	1.10 a	48.63 a	61.78 b	70.20 a	1.57 a	0.86 b	
	Goat	0.94 a	1.00 a	1.94 a	0.68 a	1.01 b	28.40 b	70.31 a	68.56 a	1.59 a	0.95 a	
Means for doses												
	0	0.90 b	1.02 a	1.92 a	0.70 a	0.88 b	9.52 d	65.58 a	76.63 a	1.84 a	1.30 a	
	2	0.80 c	0.95 b	1.76 c	0.68 a	0.88 b	23.11 c	60.30 b	64.24 b	1.66 b	0.89 b	
	4	0.79 c	0.92 c	1.71 c	0.65 b	0.93 b	33.21 b	59.88 b	64.50 b	1.53 c	0.84 b	
	8	0.93 b	0.92 c	1.85 b	0.63 b	1.13 a	50.77 a	64.24 a	67.98 a	1.63 b	0.89 b	
	12	0.96 a	0.93 c	1.89 b	0.64 b	1.17 a	60.50 a	63.00 a	69.98 a	1.56 c	0.88 b	

\* Means followed by the same letter in a column do not differ significantly by the Scott-Knott test (5%); gallic acid (GAE); ascorbic acid (AAE); Trolox (ET); antioxidant activity index (AAI).

Table 3. Chemical composition of the essential oil of *Thymus vulgaris* leaves grown with different types of fertilization.

Compounds	RI	Control	Quail				Cattle				Goat				Chemical
			kg m <sup>-2</sup>												
		0	2	4	8	12	2	4	8	12	2	4	8	12	
$\alpha$ -Thujene**	925	Nd	0.08	0.14	0.12	0.09	nd	0.07	0.07	0.06	0.06	0.22	0.14	0.11	0.09
1-Octen-3-ol	977	3.01 b	3.15 a	2.83 c	2.69 d	2.57 e	3.02 b	2.99 b	2.99 b	2.64 d	3.09 a	2.92 b	2.73 c	2.81 c	2.47 f
Myrcene	991	0.53 j	0.69 g	0.88 b	0.79 d	0.79 d	0.67 h	0.71 f	0.70 f	0.64 g	0.54 i	0.95 a	0.74 e	0.80 c	0.82 d
3-Octanol	995	0.24 b	0.25 a	0.22 d	0.22 d	0.21 e	0.24 b	0.25 a	0.25 a	0.23 c	0.25 a	0.23 c	0.21 d	0.21 d	0.20 f
$\alpha$ -Terpinene**	1016	0.34	nd	Nd	nd	0.48	0.28	nd	Nd	0.36	0.29	0.43	0.43	0.53	0.56
$\rho$ -Cymene	1023	13.8 g	18.5 b	19.1 a	17.0 c	15.8 d	16.3 d	18.1 b	18.0 b	12.7 g	14.0 f	18.9 a	14.6 e	14.5 e	11.6 h
Sylvestrene	1027	0.27 i	0.37 c	0.42 a	0.38 b	0.36 c	0.33 f	0.37 c	0.36 c	0.30 g	0.28 h	0.42 a	0.34 e	0.35 d	0.32 g
1,8-Cineole	1030	1.50 b	1.55 a	1.30 d	1.17 f	1.14 g	1.40 c	1.42 b	1.43 b	1.06 g	1.41 b	1.29 d	1.20 f	1.11 g	0.99 h
$\gamma$ -Terpinene	1057	4.94 d	3.66 h	4.49 e	4.25 f	4.88 d	4.28 f	3.84 g	3.83 g	4.67 d	3.77 g	4.80 d	5.20 c	5.65 b	6.73 a
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1065	1.14 c	0.98 f	0.98 f	1.00 e	1.00 e	1.06 d	1.00 e	1.00 e	0.89 g	1.24 a	1.09 c	1.15 b	1.06 c	1.08 d
Linalool	1100	2.74 e	2.89 b	2.79 d	2.84 c	2.80 d	2.80 d	2.86 c	2.86 c	2.98 a	3.00 a	2.70 e	2.83 c	2.83 c	2.65 f
Borneol	1164	1.96 c	2.22 a	2.00 b	1.98 b	1.89 c	1.94 c	2.04 b	2.04 b	1.49 f	2.02 b	1.73 d	1.61 e	1.53 f	1.44 g
Terpinen-4-ol	1176	0.90 c	1.01 a	0.91 c	0.93 b	0.91 c	0.95 b	0.95 b	0.95 b	0.94 b	0.87 d	0.81 f	0.82 e	0.88 c	0.71 g
Carvacrol methyl ether	1245	0.68 g	0.79 e	0.51 h	0.98 a	0.96 b	0.25 i	0.81 d	0.81 d	0.91 b	0.75 e	0.71 f	0.73 e	0.83 c	0.89 c
Thymol	1297	58.6 d	53.1 f	53.3 e	58.1 d	58.2 d	56.4 e	54.4 e	54.3 e	62.2 a	58.6 c	53.9 e	58.9 b	58.9 b	60.4 b
Carvacrol	1303	4.38 c	4.55 b	4.23 c	4.22 c	4.05 d	4.24 c	4.47 b	4.47 b	4.24 c	4.67 a	4.16 c	4.48 b	4.00 d	3.71 e
Thymol acetate**	1356	Nd	Nd	Nd	nd	nd	nd	nd	Nd	0.09	nd	Nd	nd	nd	Nd
(E)-Caryophyllene	1420	0.81 b	0.81 b	0.76 c	0.75 c	0.71 e	0.81 b	0.73 d	0.73 d	0.77 b	0.82 a	0.70 e	0.78 b	0.72 d	0.77 c
Caryophyllene oxide	1586	0.88 c	1.04 a	0.87 c	0.80 d	0.66 f	0.11 i	0.95 b	0.96 b	0.61 f	0.98 b	0.77 d	0.71 e	0.58 g	0.41 h
Total		96.7	95.6	95.7	98.2	97.5	95.1	96.0	95.8	97.8	96.6	96.7	97.6	97.4	95.8
Compounds number		17	17	17	17	18	17	17	17	19	18	18	18	18	18

\* Means followed by the same letter in a column do not differ significantly by the Scott-Knott test (5%); \*\* Compounds that were not statistically analyzed because they were not identified in all treatments.

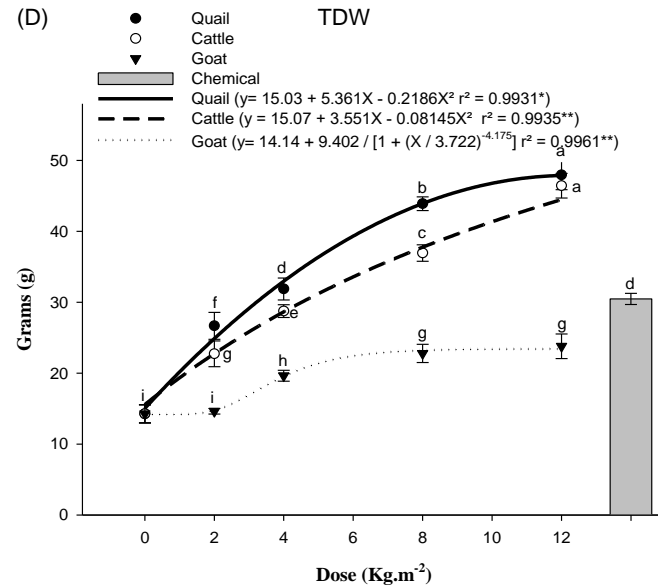
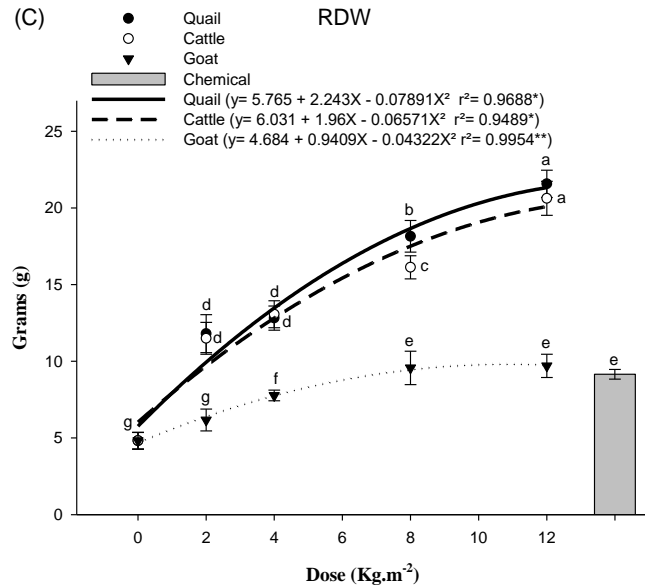
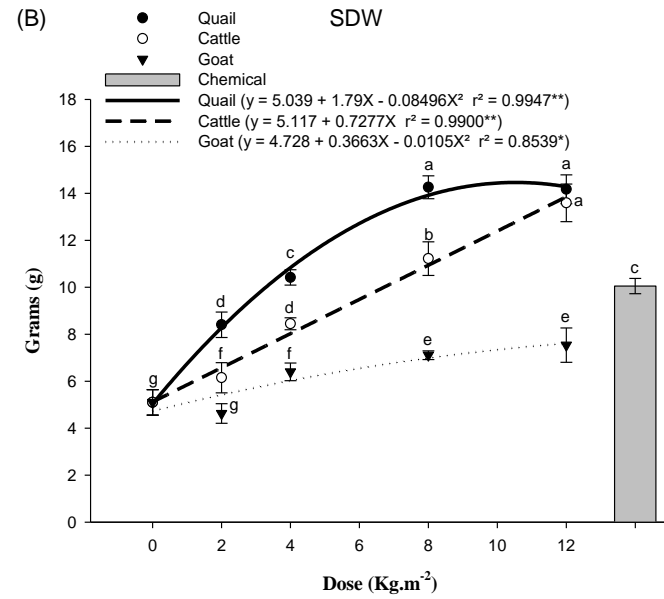
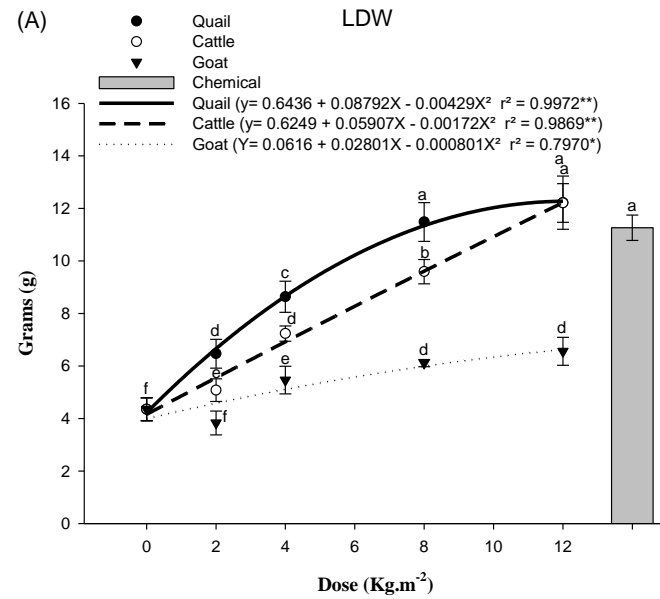




Figure 1. Effect of chemical fertilization and different sources and doses of manure on (A) leaf dry weight (LDW) (B) stem dry weight (SDW), (C) root dry weight (RDW), and (D) total dry weight (TDW) in grams (g) per pot of *Thymus vulgaris*.

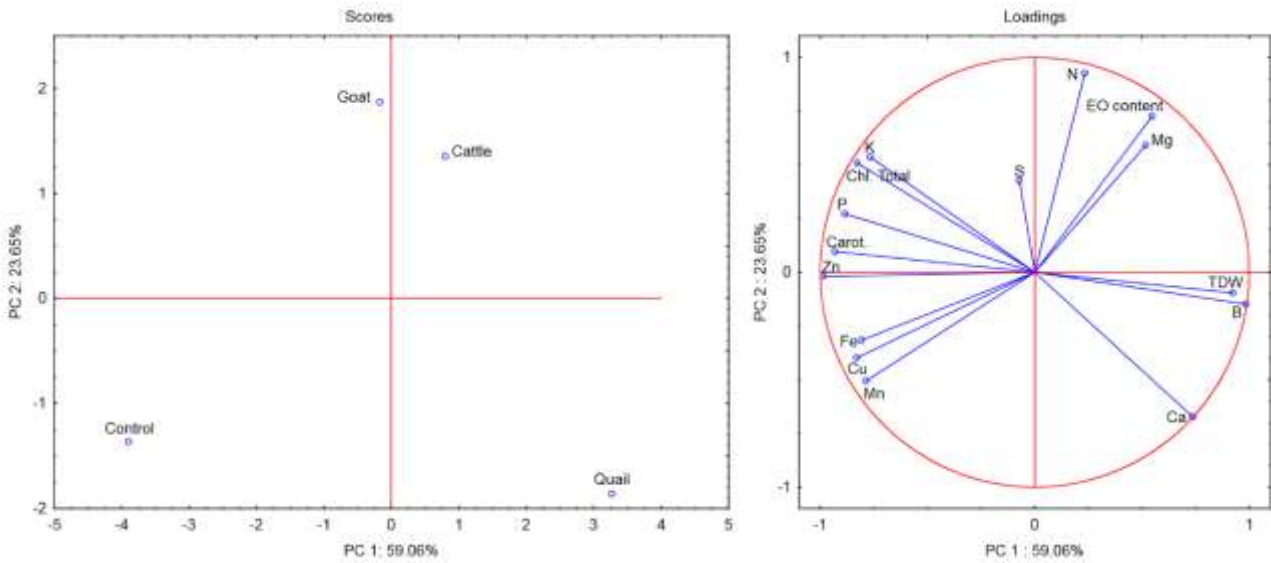


Figure 2. Principal component analysis (PCA) of the matrix correlation constructed using data from the macronutrients and micronutrient content of dry leaves, essential oil content (EO content), total chlorophyll (Chl. Total), carotenoids (Carot.), and total dry weight (TDW) of *Thymus vulgaris* grown with different types of manure (quail, cattle and goat) or without fertilization (control).

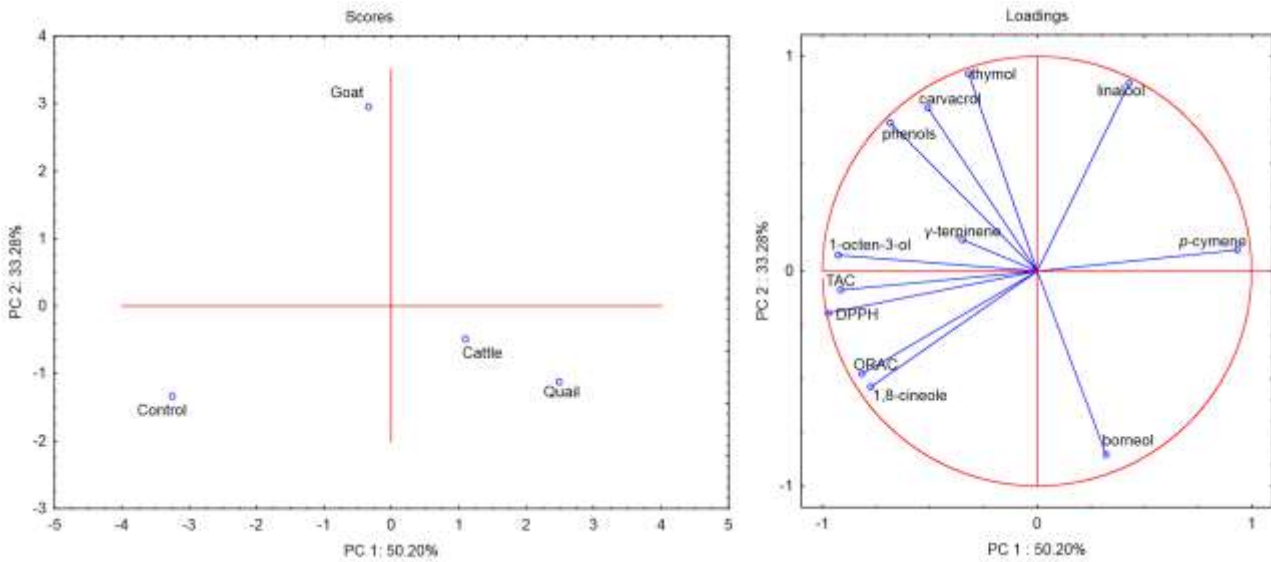


Figure 3. Principal component analysis (PCA) of the matrix correlation constructed using data on total polyphenols (Phenols), total antioxidant capacity (TAC), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), DPPH, and the main chemical compounds of the essential oil of *Thymus vulgaris* grown with different types of manure (quail, cattle, and goat) or without fertilization (control).

### 3 Considerações finais

Com base no levantamento bibliográfico realizado neste trabalho e até onde sabemos, esta tese representa a primeira pesquisa que avaliou simultaneamente aspectos de estresse oxidativo, nutricionais, fisiológicos, fitoquímicos e vegetativos em *T. vulgaris* sob a influência de diferentes adubações e malhas coloridas. Apresenta o diferencial de ter apresentado dados experimentais inéditos que compararam diferentes doses e fontes de esterco (bovino, codorna e caprino). Neste mesmo experimento foi realizado um estudo comparativo entre a principal fonte de adubação orgânica estudada (esterco) e a adubação química.

A influência de diferentes adubações no cultivo de tomilho mostraram que esta espécie é responsiva ao manejo de adubação, de forma que a adubação orgânica (com esterco) pode ser até mais prestadio que a adubação convencional (química) quando se deseja alinhar produtividade agrícola com produção quanti-qualitativa de óleo essencial e compostos químicos. A importância destes resultados torna-se maior aliando ao fato de que o cultivo dessa espécie condimentar é feito em sua maioria por pequenos produtores, que muitas vezes tem dificuldades em se obter fertilizantes químicos ou trabalham com sistema orgânico de produção. Além de comprovar cientificamente e de forma abrangente os benefícios do manejo da adubação para esta espécie. As plantas de tomilho são muito responsivas nos aspectos nutricionais, fitoquímicos e vegetativos quando adubadas com esterco de codorna e bovino. Doses entre 8 e 12 kg m<sup>-2</sup> desses dois esterco fizeram com que as plantas de tomilho chegassem ao clímax da produção de biomassa e das características quanti-qualitativas de óleo essencial e compostos químicos de interesse, nas condições pelas quais as plantas foram cultivadas. No entanto, quando se deseja recomendações seguras, é preciso ficar atento a composição química do esterco, estágio de curtimento e a condição de cultivo empregada.

Trata-se também da primeira pesquisa que fez uma análise comparativa da influência de diferentes malhas coloridas no cultivo da espécie *T. vulgaris*, cujos dados foram coletados em diferentes estações do ano na condição de clima tropical temperado chuvoso (mesotérmico). O tomilho é uma planta muito sensível ao sombreamento e as condições climáticas do local de cultivo. A constatação de que a melhor opção de cultivo de tomilho é a condição de pleno sol e as estações mais quentes do ano, em clima tropical temperado chuvoso, traz ao produtor uma informação importante e estratégica, visto que o mesmo economizará em recurso ou mesmo pode optar por produzir um maior teor de timol com o uso de malhas, visando uma produção com esta finalidade. Uma opção a ser considerada neste trabalho e que pode ser objeto de estudos futuros, é a possibilidade

de se utilizar uma maior densidade de plantas nas condições com uso de malhas, tentando assim conciliar produção agrícola e teor de timol.

Embora prelúdios, os resultados aqui apresentados, trazem uma indicação congruente de que o cultivo orgânico de *Thymus vulgaris* deve ser priorizado e que essa espécie demanda de mais pesquisas para definição de estratégias de cultivo mais seguras, uma vez que, essa espécie se mostra muito responsiva e ao mesmo tempo sensível aos fatores relacionados ao manejo fitotécnico.