



**RAFAEL MARLON ALVES DE ASSIS**

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E ADUBAÇÃO  
ORGÂNICA NA PRODUÇÃO DE FITOMASSA, ANÁLISE  
QUÍMICA FENÓLICA DO ÓLEO ESSENCIAL E DO  
POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *Melissa officinalis* L.  
(Lamiaceae)**

**LAVRAS-MG  
2019**

**RAFAEL MARLON ALVES DE ASSIS**

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E ADUBAÇÃO ORGÂNICA NA  
PRODUÇÃO DE FITOMASSA, ANÁLISE QUÍMICA FENÓLICA DO ÓLEO  
ESSENCIAL E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *Melissa officinalis*  
L.(LAMIACEAE)**

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

Prof. Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto.  
Orientador

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

Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2019**

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

Assiss, Rafael Marlon Alves de.

Fungos micorrízicos arbusculares e adubação orgânica na  
produção de fitomassa, análise química fenólica do óleo essencial e  
do potencial antioxidante de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) /  
Rafael Marlon Alves de Assiss. - 2019.

128 p. : il.

Orientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci, Marco Aurélio  
Carbone Carneiro.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Simbiose. 2. Erva-cidreira. 3. Citral. I. Pinto, José Eduardo  
Brasil Pereira. II. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. III. Carneiro,

**RAFAEL MARLON ALVES DE ASSIS**

**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E ADUBAÇÃO ORGÂNICA NA  
PRODUÇÃO DE FITOMASSA, ANÁLISE QUÍMICA FENÓLICA DO ÓLEO  
ESSENCIAL E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *Melissa officinalis* L.  
(LAMIACEAE)**

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2019.

Dr. Osmar Alves Lameira Embrapa Amazônia Oriental

Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro UFLA

Dr<sup>a</sup> Marisângela Viana Barbosa UFLA

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2019**

*Aos meus pais Heliana Ferreira Alves e Manoel Gilvan de Assis por toda educação e princípios repassados até aqui, e pelos exemplos de caráter e amor que exercem em minha vida.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS pelo dom da vida e pela oportunidade de realizar este trabalho, pois sem Ele eu não conseguiria alcançar uma parte deste sonho.

Pela minha família, em especial aos meus pais Manoel e Heliana e meu irmão Marcelo Fagner Alves de Assis, que em todo momento me apoiaram com amor, carinho e atenção, ajudando grandemente para realização deste sonho.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA por todo suporte estrutural que permitiu a concretização desse trabalho de dissertação.

Aos órgãos de fomento, como FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou meu sustento e recursos para os estudos realizados. Bem como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que em parceria com outros setores também colaboraram de forma significativa.

Ao programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, pela oportunidade.

Ao meu orientador José Eduardo Brasil Pereira Pinto, que deste o início me deu todo suporte e apoio necessário. Pela paciência e disposição em ajudar. E principalmente sou grato pelo respeito que demonstrou quanto aos meus princípios religiosos.

Aos meus coorientadores, Suzan Kelly Vilela Bertolucci e Marco Aurélio Carbone Carneiro por toda instrução e conhecimentos repassados, bem como pela dedicação nos momentos de ajuda.

Ao Dr. Osmar Alves Lameira que desde a graduação me deu todo suporte, ensino e aprendizado para está concluindo este sonho, sem a sua contribuição, isso não seria possível.

A Joana Junqueira que se dispôs a ajudar e esteve presente em grande parte da realização deste estudo, contribuindo imensamente para o mesmo.

Aos meus amigos Ana Paula, Carol Germano, Diene Xavier, Fernanda Nayara Ribeiro, Nelma Oliveira, Thainá Oliveira e Vytória Cavalcanti que contribuíram significativamente para realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos a vocês!

Aos meus amigos conterrâneos e de Pós-Graduação, Abel Bastos, Érica Marquez, Lucinda Hoffman, Raíssa Couteiro, Tainá Rocha, dentre outros, obriagdo por todo apoio e ajuda prestada.

Aos meus amigos da Igreja Adventista do Sétimo Dia (IASD) - Central de Lavras, em especial ao Dany Flávio Tonelli e Leticia Klein Tonelli pela amizade, confiança e pelos momentos de alegria proporcionados que fizeram a diferença.

Aos Técnicos do Horto de Plantas Medicinais da UFLA, Paulo, Leandro (Dico) e Giulia Duarte por toda ajuda e apoio prestado.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos, principalmente pelo técnico Evaldo Arantes de Souza que foi sempre prestativo e colaborativo com as exigências dos trabalhos.

Ao Laboratório de fitoquímica Gota da Esperança, por toda estrutura e pela a ajuda técnica da Anette Boari que foi de grande importância.

Ao Departamento de Ciência do Solo (Setor de Biologia, microbiologia, e processos biológicos do solo) pela doação dos fungos micorrízicos e por todo suporte técnico prestado, contribuindo grandemente para realização deste trabalho.

Ao Departamento de Fitopatologia, que disponibilizou a autoclave para esterilização do solo e ao técnico Bruno pelo apoio durante esse período.

Aos professores da comunidade acadêmica que contribuíram com os ensinamentos compartilhados.

Enfim, a todos que de alguma forma ajudaram e contribuíram para realização deste sonho. Eu agradeço. **MUITO OBRIGADO!!!**

## RESUMO GERAL

A espécie *Melissa officinalis* L. é originária das regiões da Europa e Ásia. Pertence a família Lamiaceae, abrangendo cerca de 200 gêneros e aproximadamente 3.200 espécies difundidas no mundo. Essa planta medicinal é conhecida amplamente pela população por diversos nomes, dentre eles: cidreira, erva-cidreira, cidreira-verdadeira. Estudos etnobotânicos demonstram efeitos sedativos, ansiolíticos e antidepressivos, entre outros. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) podem melhorar o cultivo das espécies medicinais, proporcionando maior quantidade de matéria seca vegetal e alto teor de princípio ativo. E os cuidados com a adubação podem aumentar ou diminuir a produção de fármacos e consequentemente de princípios ativos, pois a falta ou excesso de nutrientes pode interferir na composição química da planta. O uso das plantas medicinais como antioxidante vem ganhando espaço no cenário científico, pois estudos demonstram resultados promissores. Portanto, objetivou-se: (1) investigar as influências dos FMAs no cultivo das plantas medicinais, bem como, em seus compostos químicos por meio de uma revisão de literatura, (2) observar a influência de FMAs e da adubação bovina no crescimento e na composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L., (3) avaliar o potencial antioxidante sob as mesmas condições. O experimento foi desenvolvido, em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras-UFLA. O substrato 2:1 (solo:areia) foi esterilizado (autoclave), por um período de uma hora, com temperatura de 120°C sobre uma pressão de 1atm. Após 24h este processo foi repetido. O mixe de FMAs foi composto pelas espécies: *Scutellospora heterogama*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Acaulospora morrowiae*. O arranjo experimental foi organizado em Delineamento Inteiramente Casualizado - DIC em esquema fatorial 2 x 2 ( com/sem fungos – CF/SF; com/sem esterco – CE/SE) totalizando quatro tratamentos SFSE, SFCE, CFSE e CFCE. Dos 62 artigos selecionados, 42 (67,8%) demonstraram que os fungos micorrízicos influenciam significativamente no crescimento e/ou óleo essencial das plantas medicinais. Os tratamentos inoculados com FMAs (CFSE e CFCE) demonstraram taxas de porcentagem de infecção significativamente superior com 46,2 e 43,6%, respectivamente, quando comparados com os sem inoculação (SFSE e SFCE) que obtiveram 23,1 e 29,6%, respectivamente. Com a presença dos fungos micorrízicos arbusculares houve um ganho de matéria seca das plantas. Os tratamentos com inoculação demonstraram as maiores médias para rendimento de óleo, ambos com 0,01 (g de OE. Planta<sup>-1</sup>). Já os sem fungos, apresentaram as menores médias respectivamente, 0,002 e 0,004 (g de OE.Planta<sup>-1</sup>). Os tratamentos com FMAs (CFSE e CFCE) apresentaram, respectivamente, as maiores médias significativas de fenóis totais (136,45 e 136,26 mg de EAG . g<sup>-1</sup> de folha seca). Os resultados do presente estudo mostram que os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a adubação orgânica podem fornecer benefícios para a espécie *Melissa officinalis* L. A simbiose estabelecida pelos fungos micorrízicos contribuiu para o acúmulo dos constituintes principais geranyl e neral (cital) presentes no óleo essencial, bem como no acúmulo de fenóis totais em relação aos não inoculados.

**Palavras-chave:** Simbiose. Erva-cidreira. Citral.



## ABSTRACT

The species *Melissa officinalis* L. originates from the regions of Europe and Asia. It belongs to the family Lamiaceae, covering about 200 genera and approximately 3.200 species spread worldwide. This medicinal plant is widely known by the population by several names, among them: cidreira, lemon balm, true cidreira. Ethnobotanical studies demonstrate sedative, anxiolytic and antidepressant effects, among others. The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can improve the cultivation of medicinal species, providing a higher amount of plant dry matter and high active constituent content. And fertilizer care can increase or decrease drug production and hence active principles, as the lack or excess of nutrients can interfere with the chemical composition of the plant. The use of medicinal plants as an antioxidant has been gaining ground in the scientific field since studies show promising results. Therefore, we aimed to: (1) investigate the influences of AMFs on the cultivation of medicinal plants, as well as on their chemical compounds through a literature review. (2) to observe the influence of AMFs and bovine fertilization on the growth and chemical composition of the essential oil of *Melissa officinalis* L. (3) to evaluate the antioxidant potential under the same conditions. The experiment was carried out in a greenhouse at the Laboratory of Tissue Culture of the Federal University of Lavras - UFLA. The 2:1 substrate (soil: sand) was sterilized (autoclave) for a period of one hour, with a temperature of 120°C under a pressure of 1atm. After 24h this process was repeated. The mix of AMFs was composed by the species: *Scutellospora heterogama*, *Claroideoglossum etunicatum* and *Acaulospora morrowiae*. The experimental arrangement was organized in a completely randomized design (DIC) in a 2 x 2 factorial scheme (with / without fungi - CF / SF, with / without manure - CE / SE), totalizing four treatments SFSE, SFCE, CFSE e CFCE. Of the 62 selected papers, 42 (67,7%) demonstrated that mycorrhizal fungi significantly influence the growth and/or the essential oil of medicinal plants. The treatments inoculated with FMAs (CFSE and CFCE) showed significantly higher rates of infection with 46,2 and 43,6%, respectively, when compared to those without inoculation (SFSE and SFCE) with 23,1 and 29,6%, respectively. The presence of arbuscular mycorrhizal fungi there was a gain of dry matter. The treatments with inoculation showed the highest averages for oil yield, both with 0,01 (g of OE.Planta<sup>-1</sup>). On the other hand, those without fungi had the lowest averages, respectively, 0,002 and 0,004 (g of OE.Planta<sup>-1</sup>). The treatments with AMF (CFSE and CFCE) presented, respectively, the highest significant averages of total phenols (136,45 and 135,26 mg of EAG. g of dry leaf<sup>-1</sup>). The results of the present study show that arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and organic fertilization may provide benefits for *Melissa officinalis* L. The symbiosis established by mycorrhizal fungi contributed to the accumulation of major constituents like geranyl and neral (citril) present in the essential oil, as well as total phenols accumulation in relation to non-inoculated treatments.

**Keywords:** Symbiosis. Lemongrass. Citral.

## LISTA DE FIGURAS

|  |     |
|--|-----|
| CAPÍTULO I.....  | 14  |
| Figura 1.1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. ....   | 19  |
| Figura 1.2 Principais compostos químicos encontrados no óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> L.....  | 21  |
| Figura 1.3 Reação química entre BTH e radical DPPH.....  | 27  |
| CAPÍTULO II.....   | 34  |
| Figura 2.1 Documentos encontrados nas bases Scopus e Web Of Science (WOS) no primeiro levantamento bibliográfico. ....   | 40  |
| Figura 2.2 Documentos encontrados nas bases Scopus e Web Of Science (WOS) no segundo levantamento bibliográfico. ....  | 40  |
| CAPÍTULO III .....   | 57  |
| Figura 3.1 Representação das notas atribuídas durante as avaliações da colonização de FMAs em raízes da espécie <i>Melissa officinalis</i> L cultivada em casa de vegetação. ....                      | 69  |
| Figura 3.2 Comprimento da parte aérea da espécie <i>M. officinalis</i> L. a cada 15 dias durante 90 dias de avaliação sob influência dos FMAs e do esterco bovino cultivada em casa de vegetação.....  | 73  |
| Figura 3.3 Plantas de <i>M. officinalis</i> L. cultivada em casa de vegetação sob a influência dos fungos micorrízicos arbusculares e do esterco bovino. ....  | 75  |
| Figura 3.4 Folhas de <i>Melissa officinalis</i> L. com diferentes pigmentações. ....   | 79  |
| Figura 3.5 Teor (%) e rendimento (g. de OE.100g planta <sup>-1</sup> ) do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> L. cultivada sob influência de FMAs e esterco bovino em casa de vegetação. .... | 82  |
| Figura 3.6 Produtividade do óleo da espécie <i>M. officinalis</i> L. cultivada sob a influência dos FMAs e do esterco bovino em casa de vegetação.. ....   | 85  |
| Figura 3.7 Média do constituinte majoritário (citrál%) presente no óleo essencial de <i>M. officinalis</i> L. cultivada sob influência de FMAs e do esterco bovino em casa de vegetação. ....          | 88  |
| CAPÍTULO IV .....  | 97  |
| Figura 4.1 Design axial simplex (DAS).....   | 104 |
| Figura 4.2 Curva de contorno (A: 1x15 min, B: 1x15 min, C: 3x15 min) para rendimentos de constituintes fenólicos totais.....   | 109 |
| Figura 4.3 Análise do gráfico de pareto dos efeitos padronizados para o fenís totais... ..   | 110 |
| Figura 4.4 Curva de contorno (A: 1x15 min, B: 1x15 min, C: 3x15 min) para a capacidade antioxidante total (CAT).....   | 111 |
| Figura 4.5 Gráfico de pareto padronizado (p <0,05) representando os efeitos estimados de parâmetros e interações de parâmetros na atividade antioxidante.....  | 112 |
| Figura 4.7 Médias dos valores da capacidade antioxidante total (CAT) do óleo essencial de <i>M. officinalis</i> L. cultiva sob a influência de fungo e do esterco. ....                                | 117 |
| Figura 4.8 Médias dos valores da porcentagem de inibição pela captura do radical livre (DPPH) do óleo essencial. ....  | 118 |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| CAPÍTULO II.....   | 34  |
| Tabela 2.1 Resultado da revisão por ano de publicação dos 89 artigos encontrados.....  | 41  |
| Tabela 2.2 Gêneros e espécies de fungos micorrízicos utilizados ao longo dos 15 anos de estudos.....   | 42  |
| Tabela 2.3 Porcentagem dos artigos encontrados em relação aos efeitos positivos dos fungos micorrízicos nas plantas medicinais.....  | 44  |
| Tabela 2.4 Resultado da revisão por ano de publicação dos 41 artigos encontrados.....  | 44  |
| Tabela 2.5 Espécies de fungos, plantas medicinais e alguns compostos químicos encontrados no decorrer dos 12 anos de estudos.....  | 45  |
| Tabela 2.6 Influência dos fungos micorrízicos nas plantas medicinais no decorrer dos 12 anos de estudos (continua).....  | 47  |
| CAPÍTULO III .....   | 57  |
| Tabela 3.1 Análise química dos substratos usado nos tratamento para o cultivo de <i>Melissa officinalis</i> L.....   | 63  |
| Tabela 3.2 Variáveis de colonização de FMAs na espécie <i>Melissa officinalis</i> L. cultivada com e sem esterco bovino em casa de vegetação.....  | 70  |
| Tabela 3.3 Média do comprimento da parte aérea (CM) e diâmetro (DM) da espécie <i>M. officinalis</i> L. cultivada sobre influência de FMAs e da adubação bovina em casa de vegetação.....                              | 72  |
| Tabela 3.4 Média da matéria seca da folha (MSF), caule (MSC), raiz (MSR), parte aérea (MSPA), total (MST) e razão raiz / parte aérea (R/PA) da espécie <i>M. officinalis</i> L.....                                    | 74  |
| Tabela 3.5 Análise de área foliar da espécie <i>M. officinalis</i> L. cultivada sob a influência de FMAs e adubação bovina em casa de vegetação.....   | 76  |
| Tabela 3.6 Médias de clorofias a, b, total e carotenoides da espécie <i>M. officinalis</i> L. cultivada sob a influência de FMAs e adubação bovina em casa de vegetação.....   | 78  |
| Tabela 3.7 Teor de macro (N, P, K, Ca, Mg e S) e micro-nutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Zn) nas filhas de <i>M. officinalis</i> L. cultivada sob influência de FMAs e esterco bovino em casa de vegetação.....               | 80  |
| Tabela 3.8 Constituintes químicos do óleo essencial de <i>M. officinalis</i> L. cultivada sob as influências de FMAs e do esterco bovino em casa de vegetação.....   | 87  |
| CAPÍTULO IV .....  | 97  |
| Tabela 4.1 Proporções dos solventes utilizados durante os ciclos e médias dos valores extraídos de fenóis totais e da capacidade antioxidante total.....   | 113 |
| Tabela 4.2 Conteúdo de fenóis totais e flavonoides do extrato hidroetanólico de folhas secas, de plantas de <i>M. officinalis</i> L. cultivadas sob a influência de FMAs e do esterco bovino em casa de vegetação..... | 115 |
| Tabela 4.3 Médias dos valores da capacidade antioxidante total (CAT) e da atividade antioxidante pela captura do radical livre (DPPH) do extrato hidroetanólico (50%) de <i>M. officinalis</i> L.....                  | 116 |

## LISTA DE SIGLAS

CAT: Capacidade Antioxidante Total

CE: Com esterco

CF: Com fungo

DPPH: Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre 2,2difenil-1-picril-hidrazila

FMA: Fungos Micorrízicos Arbusculares

M.O: Matéria orgânica

OE: Óleos essenciais

SE: Sem esterco

SF: Sem fungo

TF: Teor de flavonoide

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO I</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....  | <b>17</b> |
| 2.1 <i>Melissa officinalis</i> L.: Aspectos gerais .....  | 17        |
| 2.1.1 Óleos essenciais .....  | 18        |
| 2.1.2 Composição química do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> L.....   | 20        |
| 2.2 Fungos Micorrízicos .....   | 21        |
| 2.3 Adubação orgânica .....   | 22        |
| 2.4 Radicais livres e antioxidante .....  | 25        |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>29</b> |
| <b>CAPÍTULO II — USO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO CULTIVO DE PLANTAS MEDICINAIS, NA PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E SEUS CONSTITUINTES QUÍMICOS: UMA REVISÃO</b> .....                         | <b>34</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>37</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>39</b> |
| 2.1 Busca de dados.....   | 39        |
| 2.2 Leitura e seleção dos artigos.....  | 39        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | <b>39</b> |
| 3.2 Efeito dos fungos micorrízicos no cultivo de plantas medicinais .....   | 41        |
| 3.3 Efeito dos fungos micorrízicos na produção de metabolitos secundários .....   | 44        |
| <b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | <b>50</b> |
| <b>REFERÊNCIA</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>CAPÍTULO III — INFLUÊNCIA DOS FUNGOS MICORRIZÍCOS ARBUSCULARES E DO ESTERCO BOVINO NO CRESCIMENTO E NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melissa officinalis</i> L. (LAMIACEAE)</b> ..... | <b>57</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>60</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>61</b> |
| 2.1 Local do experimento e material vegetal.....  | 61        |
| 2.2 Implantação do experimento .....  | 62        |
| 2.3 Densidade de esporos, coloração de raízes e contagem da colonização.....  | 64        |
| 2.3.1 Extração e contagem de esporos .....  | 64        |
| 2.3.2 Coloração de raízes e contagem da colonização .....   | 65        |
| 2.4 Análise do crescimento.....   | 66        |
| 2.4.1 Área foliar e análise nutricional.....  | 66        |
| 2.5 Análise de pigmentos fotossintéticos.....   | 66        |
| 2.6 Extração do óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> L.....   | 67        |
| 2.7 Análises químicas do óleo essencial.....  | 67        |
| 2.8 Análises estatísticas .....   | 68        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | <b>69</b> |
| 3.1 Densidade de esporos e Colonização micorrízica .....  | 69        |
| 3.2 Análises de crescimento.....  | 71        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3 Análises de pigmentos fotossintéticos .....  | 77        |
| 3.4 Análise foliar .....   | 79        |
| 3.5 Teor, rendimento e constituintes de óleo essencial .....   | 82        |
| 4 CONCLUSÃO.....   | 89        |
| REFERÊNCIAS .....  | 90        |
| <b>CAPÍTULO IV — INFLUÊNCIA DOS FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E DA ADUBAÇÃO ORGÂNICA NAS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE <i>Melissa officinalis</i> L. (LAMIACEAE)</b> | <b>97</b> |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 100       |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS .....   | 101       |
| 2.1 Local do experimento e material vegetal.....   | 101       |
| 2.2 Implantação do experimento .....   | 102       |
| 2.3 Otimização extrativa .....   | 103       |
| 2.4 Obtenção das amostras .....  | 104       |
| 2.4.1 Preparo das amostras para avaliação dos compostos fenólicos de <i>M. officinalis</i> ..  | 104       |
| 2.4.2 Obtenção do óleo essencial.....  | 105       |
| 2.5 Quantificação de compostos fenólicos.....  | 105       |
| 2.5.1 Determinação do Teor de Fenólicos Totais (FT) .....  | 105       |
| 2.5.2 Capacidade antioxidante total (CAT).....   | 106       |
| 2.5.3 Teor de Flavonoides (TF).....  | 106       |
| 2.5.4 Determinação da atividade antioxidante 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) .....   | 107       |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 108       |
| 3.1 Otimização extrativa .....   | 108       |
| 3.2 Extratos de folhas de <i>Melissa officinalis</i> L. ....   | 114       |
| 3.3 Óleo essencial <i>Melissa officinalis</i> L. ....  | 117       |
| 4 CONCLUSÃO.....   | 118       |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....  | 119       |
| REFERÊNCIAS .....  | 121       |
| APÊNDICE A .....   | 125       |
| APÊNDICE B.....  | 126       |
| APÊNDICE C .....   | 127       |

## **CAPÍTULO I**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Originária da Europa e Ásia, a melissa (*Melissa officinalis* L. – Lamiaceae) também é conhecida pelos nomes populares: cidreira, erva-cidreira, cidreira-verdadeira, cidrila, melitéia, chá-da-frança, limonete, salva-do-brasil, erva-luísia, chá-de-tabuleiro e melissa-romana. Suas folhas e inflorescências são empregadas na forma de chá, de preferência com a planta fresca, como calmante nos casos de ansiedade e insônia e também como medicação contra dispepsia, estados gripais, bronquite crônica, cefaleias, enxaqueca, dores de origem reumática, para normalizar as funções gastrintestinais e, externamente, no tratamento de manifestações virais (Lorenzi e Matos, 2008). Segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011) o chá infuso da espécie é indicado como antiespasmódico, ansiolítico e sedativo leve.

O uso das plantas medicinais é praticado de geração em geração desde os primórdios da civilização humana e a sua utilização como fitoterápico é de grande importância para população, pois se torna uma alternativa mais viável e barata para o tratamento de enfermidades. Segundo dados do Ministério da Saúde (MS) nos últimos anos entre 2013 e 2015, a procura por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) mais que dobrou: o crescimento foi de 161% (BRASIL, 2016).

Além dessa demanda, os teores e as quantidades de óleo essencial produzido pelas plantas medicinais são afetados por diversos fatores, tanto abióticos quanto bióticos. Conforme Pinto e Bertolucci (2002), a planta não se comporta da mesma maneira no período do ano. O vegetal sofre alterações e, com isso, a concentração dos princípios ativos pode variar ao longo das estações. Fatores externos, como temperatura, pluviosidade, vento, solo, latitude, altitude e época estacional, interferem, de forma significativa, na elaboração desses compostos.

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas em relação às plantas medicinais que apresentam potencialidades para atividades antioxidantes, tal fato se deve por que os antioxidantes estão diretamente ligados ao combate dos radicais livres, que são moléculas instáveis geradoras de efeitos adversos nas células do organismo. Conforme Aquino (2010), os antioxidantes são compostos que reagem com os radicais livres controlando o estresse oxidativo. Muitas doenças estão associadas à produção de radicais livres, o que têm estimulado investigações do potencial antioxidante de diversas famílias da flora mundial.



Sabendo da importância dessa espécie medicinal, bem como da atual demanda e tendo o conhecimento que a produção dos metabólitos secundários é afetada por diversos fatores (abióticos e bióticos), faz-se necessário a criação ou inovação de técnicas agrícola que possam melhorar a produção e qualidade do cultivo desse vegetal.

Um dos fatores abióticos de grande importância para a produção de plantas medicinais é a adubação orgânica, pois se consegue aprimorar as características físicas químicas e biológicas do solo, proporcionando melhores condições para o crescimento e desenvolvimento do vegetal. Segundo Azeez e Van Averbeke (2010), o uso dos resíduos animais é uma prática aplicada em todo o mundo, por resultar na manutenção da matéria orgânica (M.O), além de garantir e disponibilizar de forma eficaz e segura a recuperação de nutrientes.

Em relação aos fatores bióticos, algumas pesquisas vêm demonstrando que o uso de fungos micorrízicos arbusculares no cultivo de plantas medicinais pode influenciar expressivamente a produção de óleo essencial. No estudo realizado por Weisany et al. (2017) a presença da micorriza arbuscular aumentou significativamente os componentes de crescimento e rendimento, teor de clorofila e rendimento de óleo essencial em comparação com plantas não colonizadas.

Além disso, os fungos micorrízicos vêm ganhando destaque dentro do cenário das plantas medicinais, pois há indícios que os mesmos melhorem o cultivo dessas espécies, obtendo-se maior quantidade de matéria seca e elevado teor de princípio ativo. O recente estudo realizado por Tarraf et al. (2017) na espécie *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae), demonstrou que a simbiose entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e esta espécie vegetal promoveu o crescimento da planta e alterou a composição do óleo essencial, tal como melhorou a absorção de fósforo (P) em solos de baixa fertilidade.

No entanto, ainda são poucas as pesquisas que estão sendo realizadas sobre a simbiose de fungos micorrízicos com plantas medicinais na produção de óleos essenciais. Um dos casos específicos é o trabalho executado por Lazzara et al. (2017), no qual se argumenta que são escassas as informações sobre a capacidade dos fungos micorrízicos arbusculares afetarem a acumulação de biomassa, a produção de flores, a concentração de ativos solúveis em água e a disponibilidade de nutrientes contrastantes na espécie medicinal *Hypericum perforatum* L.

Portanto, objetivou-se investigar as influências dos FMAs no cultivo das plantas medicinais, bem como, em seus compostos químicos por meio de uma revisão de literatura; observar a influência de FMAs e da adubação orgânica no crescimento e na composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L.; e avaliar o potencial antioxidante sob as mesmas condições.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Melissa officinalis* L.: Aspectos gerais

A espécie *Melissa officinalis* L. pertence a família Lamiaceae, que abrange cerca de 200 gêneros e aproximadamente 3.200 espécies e está difundida em todo o mundo. Esse vegetal é nativo da Europa e Ásia, sendo cultivada no Brasil. É conhecida popularmente como cidreira, melissa, bálsamo, erva-cidreira, cidreira-verdadeira, cidrila, melitéia, chá-da-frança, limonete, salva-do-Brasil, erva-luísia, chá-de-tabuleiro e melissa romana (LORENZE e MATOS, 2008; GUGINSKI, 2007).

De acordo com o “The Plant List” os únicos nomes aceitos para a planta é *Melissa officinalis* L. e *Melissa officinalis* sub sp. *Inodora* Bornm., com mais nove sinônimas que são: *Melissa officinalis* sub sp. *altissima* (Sm.) Arcang; *Melissa officinalis* var. *altissima* (Sm.) K. Koch; *Melissa officinalis* var. *cordifolia* (Pers.) K. Koch; *Melissa officinalis* var. *foliosa* Briq; *Melissa officinalis* var. *graveolens* (Host) Nyman; *Melissa officinalis* var. *hirsuta* K. Koch; *Melissa officinalis* sub sp. *officinalis*; *Melissa officinalis* var. *romana* (Mill.) Woodv e *Melissa officinalis* var. *villosa* Benth. (The Plant List, 2017).

Segundo Lorenzi e Matos (2008), a espécie *M. officinalis* é considerada uma planta herbácea perene, aromática, ramificada desde a base, ereta ou de ramos ascendentes, de 30-60 cm de altura. Possui folhas membranáceas, rugosas, de 3-6 cm de comprimento e flores de cor creme, dispostas em racemos axilares, produzidas apenas nas regiões de altitude do sul do país e pode ser propagada por estacas ou sementes.

A espécie apresenta várias atividades medicinais, tais como: antidepressivas, antitumorais, antileishmania e antitripanosoma, gastroprotetor e antioxidantes conforme estudos realizados recentemente (LIN et al., 2015; JAHANBAN-ESFAHLAN et al., 2015; CUNHA et al., 2016; SABERI et al., 2016; SAFAEIAN et al., 2016).

### 2.1.1 Óleos essenciais

Conforme a International Standard Organization (ISO 9235: 2013) e a Farmacopeia Europeia (2004), óleo essencial é definido como o produto obtido a partir de material vegetal por hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação seca ou por expressão mecânica de frutos cítricos. Os óleos essenciais são compostos principalmente por terpenoides voláteis, que são produzidos pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas. Os principais compostos que formam um óleo essencial pertencem às classes químicas dos monoterpenos oxigenados, monoterpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados (MEIRELES, 2009).

De acordo com Simões e Spitzer (2010), os OE (Óleos Essenciais) possuem origem e locais diferentes, podendo ser encontrados em diferentes órgãos das plantas, como flores (rosas), folhas (eucalipto), cascas (canela), rizomas (gengibre) e frutos (laranja). Podem ser encontrados e armazenados em estruturas específicas, como pêlos glandulares (Lamiaceae), canais oleíferos (Apiaceae), bolsas lisígenas ou esquisolisígenas (Pinaceae, Rutaceae) e células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae).

Segundo Bakkali et al. (2008) os óleos essenciais exercem um grande e importante papel na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo o apetite desses animais. Além disso, o aroma desses óleos atrai agentes polinizadores, auxiliando a dispersão de pólen e sementes nas plantas (SIMÕES e SPITZER, 2010).

A composição do óleo volátil de uma planta é utilizada como fonte potencial de compostos farmacologicamente ativos como analgésicos, anti-inflamatórios, antitumorais, antibióticos e digestivos (GILLIJ; GLEISER; ZYGADLO, 2008).

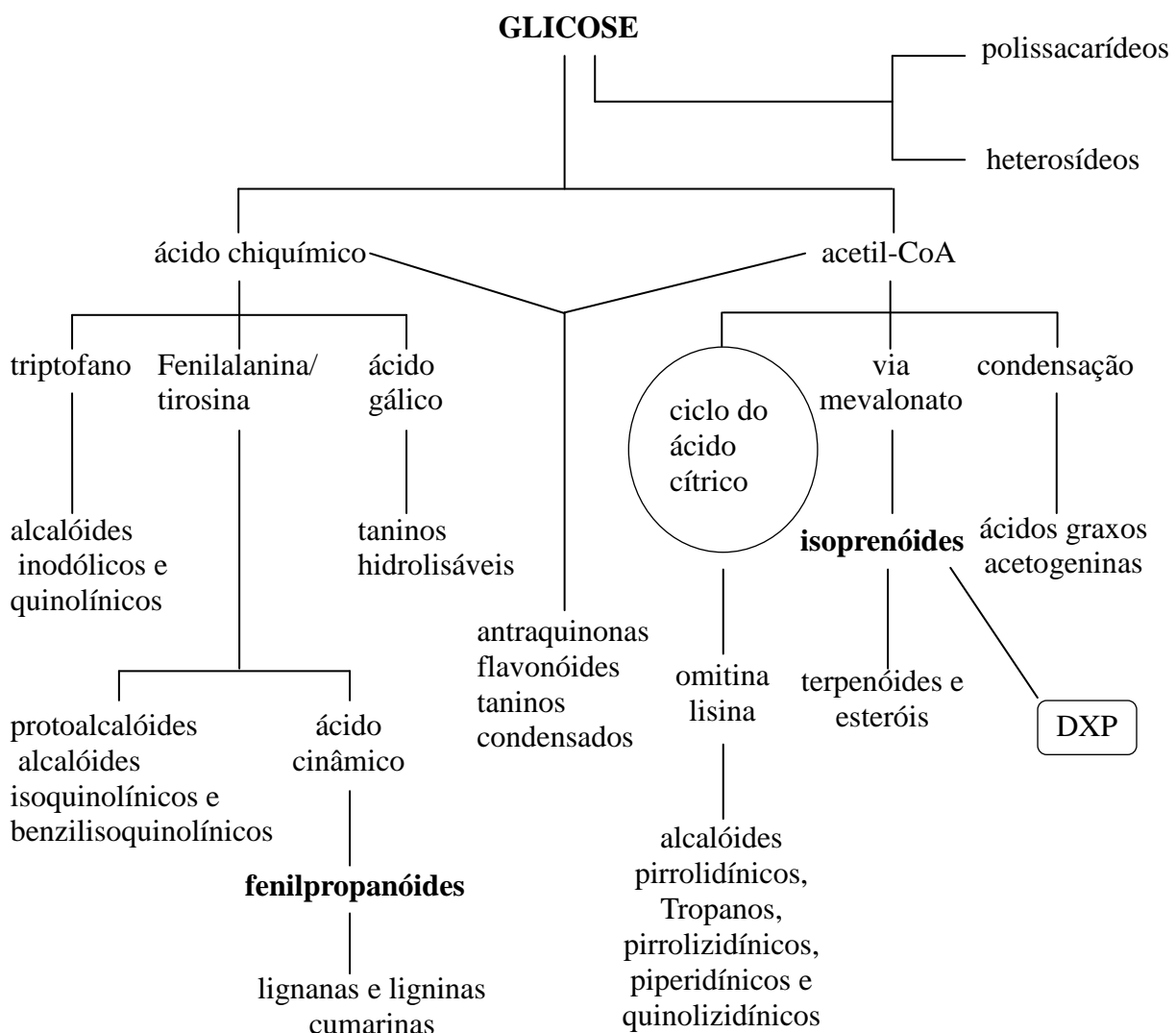
No decorrer do crescimento e desenvolvimento vegetal, durante o seu ciclo fenológico, as plantas medicinais e aromáticas podem apresentar mudanças bioquímicas e fisiológicas que podem afetar a produção de princípios ativos, tanto no aspecto quantitativo quanto no qualitativo (TAIZ e ZEIGER, 2017).

De Moraes (2009), afirma que os compostos majoritários dos óleos essenciais podem ser alterados por diversos fatores, como genéticos, técnicos (coleta, estabilização e armazenamento), bióticos ou abióticos, que podem influenciar diretamente na qualidade e, conseqüentemente, nos resultados de tratamentos e de testes biológicos sobre patógenos

humanos ou fitopatógenos. Desta forma podemos perceber que a produção de óleos essenciais é afetada diretamente pela interação genótipo/ambiente.

O metabolismo secundário dá origem aos compostos por meio de dois metabólitos intermediários, os fenilpropanóides e o isopreno (2-metil-2,3-butadieno), que são derivados do ácido chiquímico e do ácido acético, respectivamente (FIGURA 1.1) (SIMÕES et al., 2010).

Figura 1.1 — Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: Adaptado de Simões et al. 2010.

Os vegetais apresentam dois tipos de metabolismo, responsáveis por originar metabólitos com diversas funções, conforme a seguir:

**Metabólitos primários:** São aqueles que são essenciais e primordiais para a sobrevivência e desenvolvimento do ser vivo, desencadeando suas principais funções vitais, como por exemplo, algumas substâncias que fazem parte desses processos são, as proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos.

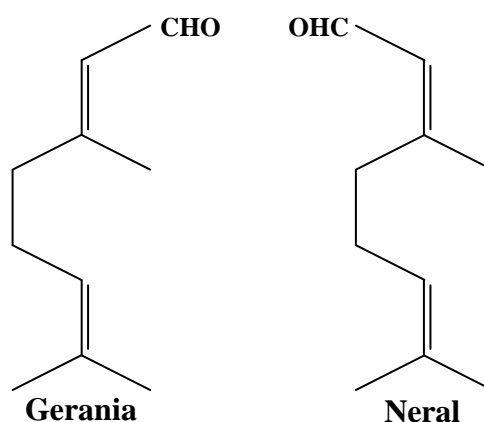
**Metabólitos secundários:** Também são denominados de metabólitos especiais, por isso são restritos a determinadas espécies, podendo estar presente ou ausente nos vegetais. Por mais que não sejam essenciais para a sobrevivência das plantas, esses metabólitos proporcionam algumas vantagens adaptativas, como repelir insetos, prevenir a herbivoria e atrair agentes polinizadores para perpetuação da espécie.

### **2.1.2 Composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L.**

De acordo com Hay e Waterman (1993), a principal classe de compostos que formam o óleo essencial da melissa são os terpenos. A classificação pode ser conforme a quantidade de carbono (C) presente no esqueleto, em mono (10C) e sesquiterpenos (15C). A estrutura principal presentes nos terpenos é a unidade do isopreno, formada por cinco carbonos. Desta forma o citral, derivado isopreno que aparece em maior quantidade no óleo essencial de *Melissa officinalis* L. é originado da rota do ácido mevalônico (COLUSSI et al., 2011).

De acordo com Lorenzi e Matos (2008), na composição química da espécie é descrita a presença de óleo essencial rico em citral, citronelal, citronelol, limoneno, linalol e geraniol, taninos, ácidos triterpenóides, flavonóides, mucilagens, resinas e substâncias amargas, bem como glicosídeos dos álcoois presentes no óleo essencial. Estudos mais recentes comprovam a presença do citral (geranial + neral - Figura 1.2) como composto majoritário presente no óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (MAFAKHERI et al., 2016; MEHRAFARIN et al., 2015; ABDELLATIF et al., 2014; NAJAFIAN 2013; AHARIZAD et al., 2013; TAHERPOUR et al., 2012).

Figuras 1.2 — Principais compostos químicos encontrados no óleo essencial de *Melissa officinalis* L.



Fonte: Do autor, 2019.

Além disto, outras pesquisas demonstram que o óleo essencial desta espécie possui efeitos antifebril, antimicrobianos e inseticidas, (EBADOLLAHI et al., 2016; ABDELLATIF et al., 2014; SERTKAYA et al., 2013).

## 2.2 Fungos Micorrízicos

A origem grega da palavra “Micorriza” significa mico [fungo] e riza [raiz]. A maioria das espécies de plantas se encontra associada a determinados fungos do solo, numa simbiose mutualística do tipo micorrízica (MOREIRA e SIQUEIRA 2006). Conforme Kistner e Parnisker (2002), aproximadamente 90% dos vegetais terrestres formam associações micorrízicas, nas quais são encontradas em quase todos os habitats do mundo. Além disso, Moreira e Siqueira (2006) afirmam que esse fenômeno é generalizado na natureza, ou seja, afirmam que os fungos micorrízicos possuem baixa preferencialidade.

De acordo com Hoffmann e Lucena (2006), as micorrizas podem ser classificadas em três tipos: ecto, endo e ectoendomicorriza. As ectomicorrizas são formadas, na maioria, por fungos septados em geral pertencentes aos basideomicetos, que só penetram intercelularmente no córtex das raízes, formando uma estrutura anatômica característica, conhecida como rede de *Hartig*, podendo também ocorrer a formação de um manto fúngico ao redor das raízes. Esse tipo de micorriza se caracteriza ainda pelas intensas modificações morfológicas das raízes colonizadas, sendo típico de árvores de clima temperado, como as coníferas.

Já, as endomicorrizas desenvolvem-se intracelularmente, ao contrário das ectomicorrizas. Os fungos micorrízicos arbusculares pertencem a ao filo Glomeromycota com 11 famílias, 19 gêneros e em torno de 237 espécies fungicas. (INVAM, 2019; REDECKER et al., 2013).

Os fungos micorrízicos arbusculares são um grupo de fungos encontrados em praticamente qualquer habitat do mundo. Possuem como características a presença de arbúsculos que são estruturas fungicas especializadas e extremamente ramificadas que interagem com o conteúdo das células corticais da raiz. A simbiose formada entre planta-fungo é considerada mutualística, apresentando uma interação genética, morfológica e funcional, formando estruturas intracelulares típicas (arbúsculos) e posteriormente desenvolve o micélio extrarradicular que é capaz de adquirir nutrientes do solo. (INVAM, 2019; BERUDE et al., 2015).

De acordo com Redecker et al., (2000), a simbiose micorrízica arbuscular é a mais ancestral dentre todos os tipos de micorrizas conhecidas. Evidências fósseis indicam que as primeiras plantas terrestres já estavam colonizadas por fungos que apresentavam estruturas miceliais e esporos similares aos dos atuais fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).

Os fungos micorrízicos arbusculares desenvolvem, fora da raiz de seu hospedeiro, um sistema altamente ramificado (micélio) de hifas (estruturas filamentosas finas de 2 a 10 µm de diâmetro) que ajuda na exploração do solo. Esses microrganismos são restritos ao parênquima cortical, não penetrando a endoderme ou colonizando o estelo da raiz. Essas estruturas aumentam a área de contato entre os simbiossiontes e permanecem rodeadas por uma membrana da planta que participa na transferência de nutrientes do fungo para as células vegetais. As hifas de FMAs têm capacidade de crescimento constante, absorção altamente eficiente, translocação e transferência rápida de nutrientes, como o fósforo, para as células da raiz. Isso significa que elas conseguem explorar o solo muito mais efetivamente e com menores recursos do que as raízes não micorrízicas (TAIZ et al. 2017).

### **2.3 Adubação orgânica**

O uso da adubação orgânica vem crescendo de maneira significativa nos últimos anos, tal fato se deve pelos inúmeros benefícios que esta prática proporciona ao solo e aos vegetais, trazendo também economia para os produtores quando usado de maneira adequada. Brito,

Vendrame e Brito (2005), afirmam que o emprego da adubação orgânica vem crescendo gradualmente no Brasil nos últimos anos e uso intensivo desse tipo de adubação pode gerar mudanças profundas nas propriedades químicas e na fertilidade dos solos. De maneira geral, os solos agrícolas são constituídos, em sua maioria, pela fração mineral e somente uma pequena porção é representada pela matéria orgânica.

Com a elevação do custo dos insumos minerais, o agricultor passou a valorizar um pouco mais o uso da adubação orgânica, dando importância à utilização de esterco que normalmente eram descartados na propriedade, passando a fazer uso desse material como agente modificador das condições físicas e químicas do solo e elevando o nível de fertilidade (SOUTO et al., 2005).

Conforme Lima et al. (2015a) o adubo orgânico ou matéria orgânica são todos aqueles produtos provenientes de resíduos de origem vegetal, urbano ou industrial e animal, que possuem altos teores de componentes orgânicos. Podendo trazer ganhos econômicos para os produtores, e proporcionar inúmeras vantagens para o solo, melhorando as propriedades, físicas, químicas e biológicas, onde as plantas irão absorver facilmente os nutrientes disponíveis em um solo orgânico.

Em relação a essas diversidades de benefícios e vantagens que adubos orgânicos geram para as plantas e para o solo, Santiago e Rossetto (2018), apresentam alguns desses favorecimentos:

I- redução do processo erosivo; II- maior disponibilidade de nutrientes às plantas; III- maior retenção de água; IV- menor diferença de temperatura do solo durante o dia e a noite; V- estimulação da atividade biológica; VI- aumento da taxa de infiltração; VII- maior agregação de partículas do solo.

No trabalho realizado por Das et al. (2018), foi comprovado que o emprego da adubação orgânica melhorou muitas propriedades do solo como: densidade aparente; retenção de água; pH; N / P / K e atividade enzimática. Além, de aumentar a capacidade de armazenamento de carbono orgânico do solo.

O conteúdo de M.O dos solos merece atenção especial, pois é o resultado da decomposição de resíduos animais e vegetais e varia, principalmente, com as práticas de manejo adotadas em cada propriedade agrícola. Além disso, é influenciado diretamente pelas condições edafoclimáticas de cada região (BRITO; VENDRAME; BRITO, 2015).



Ou seja, o teor de M.O e sua decomposição estão diretamente ligados a produção de substâncias húmicas como: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina. São substâncias relativamente estáveis geradas pela decomposição microbiana e também alguns compostos não húmicos como lignina e compostos fenólicos que devido à sua resistência à decomposição tendem a acumular no solo como partes semi degradadas ou retrabalhadas por ação microbiana (AMENDOLA, 2017).

Pesquisas realizadas por Lima et al. (2015a), mostraram que esterco de gado aumentou a capacidade de troca catiônica, a capacidade de retenção da água, a porosidade do solo e a agregação do substrato. Sendo que a eficiência do esterco depende do grau de decomposição, da origem do material, dos teores de elementos essenciais às plantas e da dosagem empregada. A sua composição também é muito variável, pois depende de alguns fatores, tais como: espécie do animal, idade, raça, alimentação, material usado como cama, tratamento da matéria prima inicial e distribuição do esterco no campo.

Além disso, essa prática gera uma redução nos custos de produção pelo menor uso de adubos químicos nos plantios e dá um destino ao grande volume de excremento produzido nas propriedades.

Os cuidados com a adubação nas plantas medicinais é de grande importância visto que o estresse causado pela falta ou excesso de nutrientes pode interferir na composição química da planta, aumentando ou diminuindo a produção de fármacos e conseqüentemente de princípios ativos. (LAMEIRA e PINTO, 2008).

Muitos estudos demonstram que o uso da adubação orgânica proporciona um melhor crescimento e aumenta a qualidade e quantidade dos óleos essenciais em diversas espécies de plantas medicinais. Gundadon et al. (2018), obtiveram maior produção de folhas em *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. ao usar adubação orgânica. O esterco de galinha condicionou maior rendimento de óleo essencial na espécie *Hyptis suaveolens* L. (DE MESQUITA ARRUDA et al., 2018). Maiores rendimento e conteúdo de  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), ácido  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinólico (THCA) e canabinóides foram obtidos em condições orgânicas conforme Caplan, Dixon e Zheng (2017).

## 2.4 Radicais livres e antioxidante

De acordo com Halliwell (1994), os radicais livres são espécies químicas compostas de um átomo ou agregações de átomos, apresentando um elétron desemparelhado em sua órbita mais externa. Desta forma, ocorre uma alta instabilidade energética e cinética uma vez que para se manterem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula.

Para Chorilli, Leonardi e Salgado (2007), os radicais livres são pequenas moléculas instáveis, originadas a partir da energia recebida por um átomo de oxigênio extremamente reativo, que de alguma forma perdeu um elétron de sua camada mais externa. Conseqüentemente uma das principais fontes de radicais livres produzidos no organismo vem do metabolismo normal do oxigênio.

Grande parte dos radicais livres age de forma rápida, podendo ser produzidos com a mesma velocidade com que desaparecem, desta maneira quando atacam podem transformar a molécula atacada em um outro radical livre, gerando reações em cadeia bastante danosas. Os mais perigosos são provenientes do oxigênio, que são o radical hidroxila (-OH) e o radical superóxido, que consiste em dois átomos de oxigênio associados ( $O_2$ ) com um único elétron não-pareado. Em termos gerais, o dano provocado pelos radicais livres apresenta uma reação química conhecida como oxidação, e os ataques dos radicais livres sobre o tecido são conhecidos como estresse oxidativo (CHORILLI, LEONARDI e SALGADO, 2007).

A expressão antioxidante é muito variada conforme cada autor, porém alguns definem como uma família heterogênea de moléculas naturais, presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas que supostamente protegeriam o organismo, podendo prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo. Essas moléculas são muito importantes para o ser humano, pois atacam os radicais livres que geram danos à saúde (COTINGUIBA et al., 2013).

A oxidação faz parte de um dos processos fundamentais na vida dos seres aeróbica e do metabolismo. Portanto, os radicais livres são originados naturalmente ou por alguma disfunção biológica e estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, o excesso de radicais provoca efeitos maléficos ao organismo, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e ácido desoxirribonucleico (DNA) (MIRANDA, 2010).

Estudos realizados por Cotinguiba et al. (2013), apresenta algumas divisões e classificações que os antioxidantes podem ter, que são quanto a sua classe e quanto ao seu modo de ação. Quanto às classes, eles podem apresentar atividade enzimática e não enzimática, já no modo de ação podem ser primários e secundários, a seguir:

A atividade enzimática são os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Já a atividade não enzimática são moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos.

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Já os antioxidantes secundários, atuam retardando as etapas de iniciação da autoxidação por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singletes.

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonoides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros (AQUINO et al., 2017).

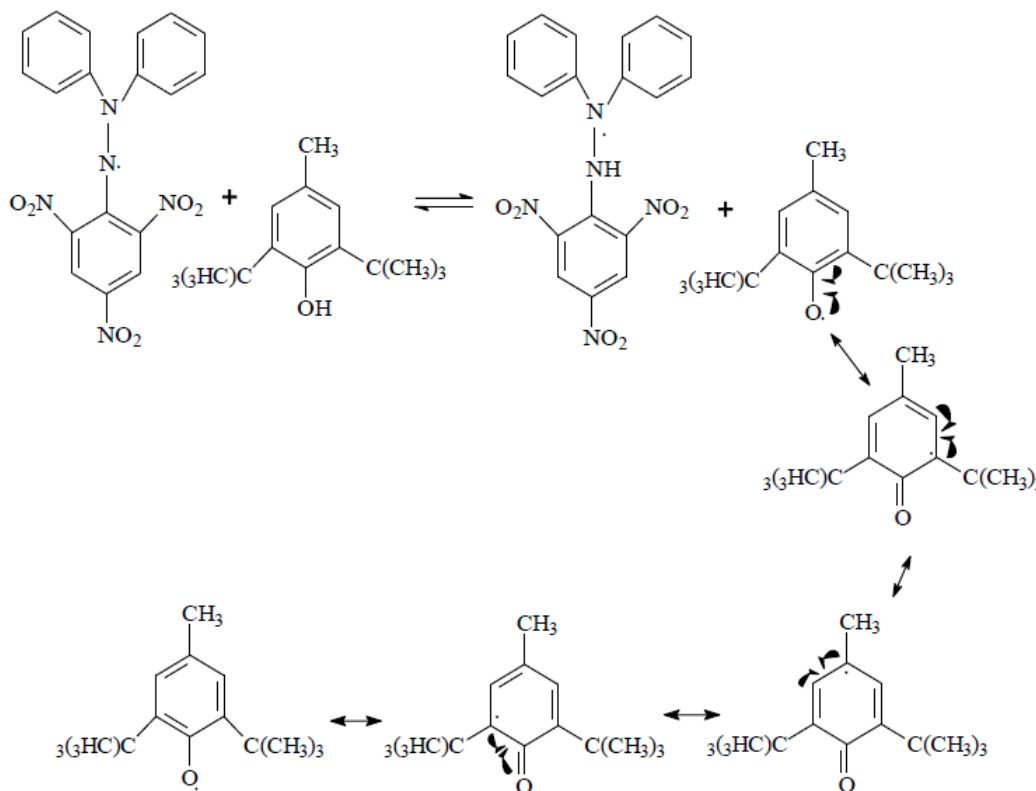
Em relação aos métodos analíticos da Capacidade Antioxidante Total (CAOT) Vasconcelos et al. (2007) afirmam que os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. São chamados ensaios de capturação (“trap assays”). Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (“Electron Spin Resonance” ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa. Dentre os testes mais utilizados, citam-se aqueles conhecidos pelas siglas TRAP (Total Radical – “Trapping Antioxidant Parameter”), ORAC (“Oxygen-Radical Absorbancy Capacity”), FRAP (“Ferric-

Reducing Ability of Plasma”) e TEAC (“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”) ou Teste do ABTS (Determinação da Atividade de Eliminação de Radicais Livres).

O método de sequestro de radicais livres do DPPH se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA, 2006).

Ao adicionar substâncias com atividade antioxidante, estas reduzem o DPPH e a solução torna-se amarelada. Os antioxidantes doam H radical para o radical DPPH, estabilizando-o e, em seguida, tornam-se radicais, que são facilmente estabilizados por ressonância (Figura 1.3). Na ausência de atividade antioxidante, não há descoloramento ou redução da solução com radical DPPH. Assim, quanto maior atividade antioxidante, maior descoloramento da solução (MIRANDA, 2010).

Figura 1.3 — Reação química entre BTH e radical DPPH.



Fonte: Miranda, 2010.

Quanto ao potencial das plantas medicinais como antioxidantes, diversas pesquisas científicas demonstram resultados promissores do seu uso nesta ocasião. Safaeian et al. (2016) comprovaram em estudos que o extrato de *Melissa officinalis* L. apresentou efeitos antioxidantes e citoprotetores contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células endoteliais da veia umbilical humana. Outras espécies medicinais avaliadas com potencial antioxidante nos últimos anos são: *Matricaria recutita* L., *Valeriana jatamansi* Jones; *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett., *Inga vera* Willd., *Ocimum basilicum* L. (GUPTA, SAIKIA e PANDEY, 2017; JUGRAN et al., 2015; LIMA et al., 2017; LIMA, CAMPOS e DA SILVA, 2015b; TOUSSAINT, SMITH e SMITH, 2007).

## REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 772-781, 2014.
- AHARIZAD, S. et al. Assessment of relationship between effective traits on yield and citral content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) populations using path analysis. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 6, n. 5, p. 4447-4452, 2013.
- AMENDOLA, D. F. 2017. 92 p. **Caracterização da matéria orgânica do solo e sua influência nas propriedades físico-químicas no sistema Latossolo-Gleissolo**. Dissertação (Mestrado em Geociências e meio ambiente). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio claro, SP, 2017.
- ANVISA. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**. Formulário de Fitoterápica Farmacopeia Brasileira. 1º Ed. 2011.
- AQUINO, V. V. F. et al. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de Croton heliotripifolius e Croton blanchetianus. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 28-31, 2017.
- AZEEZ, J. O.; VAN AVERBEKE, W. Nitrogen mineralization potential of three animal manures applied on a sandy clay loam soil. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5645-5651, 2010.
- BAKKALI, F., et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46, pp.446-475, 2008.
- BERUDE, M. C. et al. Micorrizas e Sua Importância Agroecológica. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer-Goiânia, v. 11, n. 22, p. 132-146, 2015.
- BERBARA, R. L. L.; Souza, F. A; Fonseca, H. M. A. C. III - **Fungos micorrízicos arbusculares**: muito além da nutrição. Nutrição mineral de plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, p. 54-84, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Seminário de 10 anos da política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, DF, 2016. Disponível em:<<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>>. Acesso em: 15 de nov. 2018.
- BRITO, O. R; VENDRAME, P. R. S; BRITO, R. M. Alterações das propriedades químicas de um Latossolo Vermelho distroférico submetido a tratamentos com resíduos orgânicos. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 33-39, 2005.
- CAPLAN, D; DIXON, M; ZHENG, Y. Optimal rate of organic fertilizer during the vegetative-stage for cannabis grown in two coir-based substrates. **HortScience**, v. 52, n. 9, p. 1307-1312, 2017.
- CUNHA, F. et al. HPLC-DAD phenolic profile, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activity of *Melissa officinalis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 9, p. 1664-1670, 2016.
- COLUSSI, T. C. et al. *Melissa officinalis* L: Características gerais e biossíntese dos principais metabólitos secundários. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 5, n. 2, 2011.

COTINGUIBA, G. G. et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. *Journal of Health Sciences*, v. 15, n. 3, 2015.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 88, n. 3, p. 113-118, jul./set. 2007.

DAS, S. et al. Impact of edaphic factors and nutrient management on the hepatoprotective efficiency of Carlinoside purified from pigeon pea leaves: An evaluation of UGT1A1 activity in hepatitis induced organelles. **Environmental Research**, v. 161, p. 512-523, 2018.

DE MESQUITA ARRUDA, M. V. et al. Influence of nutrition and water stress in *Hyptis suaveolens*. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 511-519, 2018.

DE MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Hortic. bras.**, v. 27, n. 2, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EBADOLLAHI, A.; ASHRAFI PARCHIN, R.; FARJAMINEZHAD, M. Phytochemistry, toxicity and feeding inhibitory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil against a cosmopolitan insect pest; *Tribolium castaneum* Herbst. **Toxin Reviews**, v. 35, n. 3-4, p. 77-82, 2016.

FARMACOPEIA EUROPEIA. **Strasbourg**: Council of Europe, 5. ed. v. 2, 2004.

GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresou. Technol.*, v.99, p.2507-25-15, 2008.

GUGINSKI, G. **Análise das propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Melissa officinalis* L.** 2007. 110 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

GUNDADON, H. et al. Shading and vegetable-bread-fish waste compost effects on growth and yield of field grown *andrographis paniculata* (Kesan Teduhan Dan Kompos Sisa Sayuran-Roti-Ikan Terhadap Pertumbuhan Dan Hasil *Andrographis Paniculata* di Ladang). **Malaysian Journal of Science**, v. 37, n. 1, p. 10-24, 2018.

GUPTA, R; SAIKIA, S. K; PANDEY, R. Bioconsortia Augments Antioxidant and Yield in *Matricaria recutita* L. Against *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood Infestation. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, v. 87, n. 2, p. 335-342, 2017.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HAY, R. K. M; WATERMAN, P. G. *Physiology. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production.* Essex, England: Longman, **Scientific & Technical**, p. 23-46, (1993).

HOFFMANN, L. V.; LUCENA, V. S. **Para entender Micorrizas Arbusculares**. Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E), 2006.

INVAM. International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Disponível em: <<https://invam.wvu.edu/collection/general-information/species-diversity>>. Acessado em: 21 de mar. 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. ISO 9235:2013: **aromatic natural raw materials**: vocabulary. Geneva: ISO; 2013.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A. et al. Anti proliferative properties of *Melissa officinalis* in different human cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 14, p. 5703-5707, 2015.

JUGRAN, A. K. et al. The effect of inoculation with mycorrhiza: Am on growth, phenolics, tannins, phenolic composition and antioxidant activity in valeriana jatamansi jones. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 1036-1049, 2015.

KISTNER, C; PARNISKE, M. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. **Trends in plant science**, v. 7, n. 11, p. 511-518, 2002.

LAMEIRA, O. A; PINTO, J. E B. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Embrapa Amazônia Oriental, 1ª Ed. Belém-Pa, 34, p. 2008.

LAZZARA, S; MILITELLO, M; CARRUBBA, A; NAPOLI, E; SAIA, S. Arbuscular mycorrhizal fungi altered the hypericin, pseudohypericin, and hyperforin content in flowers of *Hypericum perforatum* grown under contrasting P availability in a highly organic substrate. **Journal Mycorrhiza**. V.27. p. 345-354. 2017.

LIMA, B. V et al. A adubação orgânica e a sua relação com a agricultura e o meio ambiente. **V Encontro científico e simpósio de educação unisalesiano**. A pesquisa frente a inovação e ao desenvolvimento sustentável. Unisalesiano, SP, outubro, 2015a.

LIMA, C. S. et al. Mycorrhizal symbiosis increase the level of total foliar phenols and tannins in *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett seedlings. **Industrial Crops and Products**, v. 104, p. 28-32, 2017.

LIMA, C. S; CAMPOS, M. A. S; DA SILVA, F. S. B. Mycorrhizal Fungi (AMF) increase the content of biomolecules in leaves of *Inga vera* Willd. seedlings. **Symbiosis**, v. 65, n. 3, p. 117-123, 2015b.

LIN, S. H. et al. A medicinal herb, *Melissa officinalis* L. ameliorates depressive-like behavior of rats in the forced swimming test via regulating the serotonergic neurotransmitter. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 266-272, 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2ª Ed. Nova Odessa, SP, p. 312, 2008.

MAFAKHERI, S. et al. Effect of Bio and Chemical Fertilizers on the Essential Oil Content and Constituents of *Melissa officinalis* (Lemon Balm). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 19, n. 5, p. 1277-1285, 2016.



- MEIRELES, M.A.A. Extracting bioactive compounds for food products: the ory and applications. **Boca Ranton: CRC**,464p. 2009.
- MEHRAFARIN, A. et al. Phytochemical and morpho-physiological responses of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tobio stimulants application. **Journal of Medicinal Plants**, v. 14, n. 55, p. 29-42, 2015.
- MIRANDA, C. A. S. F. de. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas**. 2010. 151 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- MOREIRA, F. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Ed. da UFLA, 2006.
- NAJAFIAN, S. Rapid extraction and analysis of volatile oils components of *Melissa officinalis* using head space and gas chromatography/massspectrometry. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 19, n. 4, p. 340-347, 2013.
- PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Universidade Federal de Lavras, UFLA. Fundação de Apoio ao Estudo Ensino e Extensão, FAEPE. MG- Lavras. 2002.
- Redecker, D. et al. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). **Mycorrhiza**. v. 23, n. 7, p. 515-531, 2013.
- REDECKER, D; MORTON, J.B; BRUNS, T.D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). **Molec. Phylog. Evol.**, 14:276-284, 2000.
- SABERI, A. et al. The effects of methanolic extract of *Melissa Officinalis* on experimental gastric ulcers in rats. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 18, n. 7, 2016.
- SAFAEIAN, L. et al. Protective effect of *Melissa officinalis* extract against H2O2-induced oxidative stress in human vascular endothelial cells. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 5, p. 383-389, 2016.
- SANTIGO, A. D; ROSSETTO, R. **Adubação Orgânica**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_37\\_711200516717.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_37_711200516717.html)> acesso em: 13 de dez. 2018.
- SERTKAYA, E. Fumigant toxicity of the essential oils from medicinal plants against bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 553-555, 2013.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, C.M.O. (Org.) 6 ed. 1 reimp. Porto Alegre: Editora: UFRGS, Flórinópolis, Editora UFSC, 2010.
- SOUTO, P. C. et al. Decomposição de esterco dispostos em diferentes profundidades em área degradada no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, p. 125-130, 2005.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª Ed. Artmed Edit, p. 136-139, 2017.

TAHERPOUR, A. et al. Chemical composition analysis of the essential oil of *Melissa officinalis* L. from Kurdistan, Iran by HS/SPME method and calculation of the biophysico chemical coefficients of the components. **Natural Product Research**, v. 26, n. 2, p. 152-160, 2012.

TARRAF, W; RUTA, C; TAGARELLI, A; DE CILLIS, F; DE MASTRO, G. Influence of arbuscular mycorrhizae on plant growth, essential oil production and phosphorus uptake of *Salvia officinalis* L. **Journal Industrial Crops and Products**. V.102. p. 144-153. 2017.

TOUSSAINT, J. P.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 4, p. 291-297, 2007.

THE PLANT LIST. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tp11.1/search?q=melissa+officinalis>>. Acesso em: 05 de Nov. 2017.

VASCONCELOS, S. M. L; GOULART, M. O. F; MOURA, J. B. F; MANFREDINI, V; BENFATO, M. S; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím Nova**, v. 30, No. 5, 2007.

WEISANY, W. et al. *Funneliformis mosseae* fungi changed essential oil composition in *Trigonella foenumgraecum* L., *Coriandrum sativum* L. and *Nigella sativa* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 3, p. 276-287, 2017.

**CAPITULO II**  
**USO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO CULTIVO DE PLANTAS**  
**MEDICINAIS, NA PRODUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E SEUS CONSTITUINTES**  
**QUÍMICOS: UMA REVISÃO**

## RESUMO

Os teores e as quantidades de óleo essencial produzido pelas plantas medicinais são afetados por diversos fatores, tanto abióticos quanto bióticos. O objetivo deste estudo foi verificar por meio de uma revisão de literatura o efeito dos fungos micorrízicos no óleo essencial de plantas medicinais e suas substâncias químicas. O presente trabalho foi realizado por meio de um instrumento base chamado Periódico Capes, através das bases de pesquisas Scopus e Web Of Science (WOS). Realizou-se uma filtragem detalhada para reunir os artigos que realmente contemplavam o objetivo do estudo, em que foram analisados os títulos de todas as literaturas, bem como os seus resumos. Dos 62 artigos selecionados, 42 (62,7%) deles demonstraram que os fungos micorrízicos arbusculares influenciam significativamente no crescimento e/ou no óleo essencial das plantas medicinais, ou seja, promoveram um melhor desenvolvimento do vegetal e um óleo essencial de qualidade. Em relação à qualidade do solo, 5 pesquisas (6,7%) elucidaram que os fungos micorrízicos melhoram a sua estrutura física, como a estabilidade e agregação, que consequentemente aprimoram a função e diversidade de microrganismo na rizosfera. Além disso, conforme as pesquisas realizadas no segundo levantamento para verificar a influência dos fungos micorrízicos arbusculares nos constituintes químicos, dos 41 artigos, 37 (90,24%) apresentaram resultados positivos em relação a produção de metabólitos secundários. Portanto, pode-se concluir que os fungos micorrízicos em simbiose com as plantas medicinais, influenciam significativamente de maneira benéfica, tanto no crescimento do vegetal como no teor, rendimento e qualidade do óleo essencial e seus metabólitos secundários. Confirmando que esse tipo de microrganismo pode ser considerado uma estratégia sustentável, baseada em recursos naturais, a fim de maximizar o cultivo de espécies de plantas medicinais.

**Palavras-chaves:** Simbiose. Plantas medicinais. Metabolismo secundário.

## ABSTRACT

The contents and amounts of essential oil produced by medicinal plants are affected by several factors, both abiotic and biotic. The objective of this study was to verify through a literature review the effect of mycorrhizal fungi on the essential oil of medicinal plants and their chemical substances. This work was carried out by means of a basic instrument called Capes Journal, through the research bases Scopus and Web of Science (WOS). Detailed filtering was carried out to gather the papers that really contemplated the purpose of the study, where the titles of all the literature were analyzed, as well as their summaries. Of the 62 papers selected, 47 (62,7%) of them showed that arbuscular mycorrhizal fungi significantly influenced the growth and/or the essential oil of medicinal plants, in other words, they promoted a better development of the vegetable and quality essential oil. Regarding soil quality, 5 studies (6,7%) have elucidated that mycorrhizal fungi improve their physical structure, such as stability and aggregation, and consequently improve the function and diversity of microorganisms in the rhizosphere. In addition, according to the research carried out in the second survey to verify the influence of arbuscular mycorrhizal fungi on the chemical constituents, of the 41 articles, 37 (90,24%) presented positive results in relation to the production of secondary metabolites. Therefore, it can be concluded that mycorrhizal fungi, in symbiosis with medicinal plants, have a significant beneficial influence on plant growth and on the content, yield and quality of the essential oil and its secondary metabolites, confirming that this type of microorganism can be considered a sustainable strategy based on natural resources in order to maximize the cultivation of medicinal plant species.

**Keywords:** Symbiosis. Medicinal Plants. Secondary metabolism.

## 1 INTRODUÇÃO

A associação simbiótica mutualista entre plantas e fungos denominada como micorrízicos arbusculares (FMAs) foi descoberta há mais de 400 milhões de anos atrás. Os estudos desse tema tem descoberto que essa associação proporciona a produção de hifas fúngicas ligadas às plantas e que facilitam a absorção de nutrientes e fornece outros benefícios diretos e indiretos aos vegetais. Esses benefícios que podem ser fisiológico, nutricional, ecológico ou qualquer combinação desses processos (INVAM, 2019).

As hifas dos FMAs crescem por meio da germinação dos esporos no solo ou por raízes infectadas e penetram na epiderme da raiz colonizando o parênquima cortical, estendendo-se através dos espaços intercelulares e invadindo as células corticais para formar tando estruturas altamente ramificadas (arbúsculos) quanto complexas (hifas enoveladas). Essas estruturas podem desempenhar um papel significativo na absorção de fosfato e outros nutrientes. A planta hospedeira supre os fungos micorrízicos associados com carboidratos e em retorno recebe nutrientes deles (TAIZ et al., 2017).

A utilização de fungos micorrízicos arbusculares vem ganhando grande importância no cenário da agricultura, pois esses seres aumentam a capacidade do vegetal de explorar o solo, proporcionando uma maior absorção de água e nutrientes, e em troca os fungos recebem fotoassimilados das plantas (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006). Além disso, Berude et al. (2015) colaboram afirmando que os fungos micorrízicos são úteis para a natureza e para o homem, pois exercem papel significativo para a funcionalidade e a manutenção dos ecossistemas naturais e manejados, auxiliam no desenvolvimento das plantas e contribuem para a estruturação de comunidades vegetais.

Em relação às plantas medicinais, algumas pesquisas demonstram que os fungos micorrízicos arbusculares melhoram o crescimento vegetativo, a quantidade e qualidade dos óleos essenciais. Pesquisas realizadas por Lima et al. (2017), com a espécie *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett, comprovaram que a colonização com fungos micorrízicos arbusculares, favoreceu a produção de mudas e aumentou os constituintes de fenóis e taninos, que são compostos de importância farmacológica.

A produção de metabolitos secundários é influenciada por diversos fatores, tanto abióticos como bióticos. Na pesquisa executada por Gobbo-Neto e Lopes (2007), são abordados alguns desses principais fatores abióticos como: Sazonalidade, ritmo circadiano,

desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânico ou ataque de patógenos.

No que tange aos fatores bióticos, estudos evidenciam que os fungos micorrízicos arbusculares podem influenciar significativamente nesse processo. Amiri et al. (2017), concluiu em sua pesquisa que a colonização de fungos micorrízicos arbusculares na espécie *Pelargonium graveolens* L. pode afetar sinergicamente a biomassa total, o teor de óleo essencial e a absorção de elementos minerais.

De acordo com a Sociedade Nacional de Agricultura-SNA (2017), o Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais e, ao lado da Índia, China e Indonésia, é considerado um dos quatro grandes produtores mundiais. Além disso, há, pelo menos, 300 óleos essenciais de interesse comercial no mundo e, entre os 18 mais importantes, o Brasil lidera a produção de dois: laranja (*Citrus sinensis* L.) e lima destilada (*Citrus aurantifolia* Christm.) Swingle.

Um elemento considerável, é que o conhecimento aprofundado do uso dos fungos micorrízicos arbusculares pode ser uma ferramenta e uma estratégia significativa para maximizar a produção das plantas medicinais, podendo resultar em maior biomassa de farmacógenos, tal como, elevado teor de princípio ativo.

Conseqüentemente, outro fator relevante está nos avanços das pesquisas nessa área, pois mesmo com os estudos já realizados até o momento, os trabalhos ainda são insuficientes quando relacionamos fungos micorrízicos arbusculares com as plantas medicinais. Berude et al. (2015), afirma que, apesar da importância ecológica e econômica, as micorrizas são pouco estudadas e pouco divulgadas. Assim sugere-se a realização de novos estudos sobre as aplicações das micorrizas.

Por tanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a influências dos fungos micorrízicos arbusculares no cultivo das plantas medicinais, bem como em seus compostos químicos por meio de uma revisão de literatura.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Busca de dados**

O presente trabalho foi realizado por meio de um instrumento base chamado Periódico Capes, através das bases de pesquisas Scopus e Web Of Science (WOS). Para ambas as bases foram utilizadas as seguintes palavras chaves: na primeira (1º) pesquisa, “Medicinal plant”, “Essential oil” e “Mycorrhizal fungi”. Já no segundo (2º) levantamento bibliográfico, foram usadas as seguintes palavras: “Medicinal plant”, “Mycorrhizal fungi” e “chemical compounds”. Sendo que para baixar os documentos pesquisados foi utilizado Software EndNote.X7.

### **2.2 Leitura e seleção dos artigos**

Após essas etapas, foram montadas planilhas no Softwer Excel para se realizar mais uma filtragem detalhada para reunir os artigos que realmente contemplavam o objetivo do estudo, onde foram analisados os títulos de todas as literaturas, bem como os seus resumos (Abstract). A planilha foi composta das seguintes elementos: número do artigo, título, objetivo, conclusão, espécie do fungo, finalidade do estudo, parte da planta estudada, classe metabólica/compostos químicos e ano do artigo. Ao final deste processo foram selecionados no 1º e 2º levantamento bibliográfico 62 e 41 artigos, respectivamente.

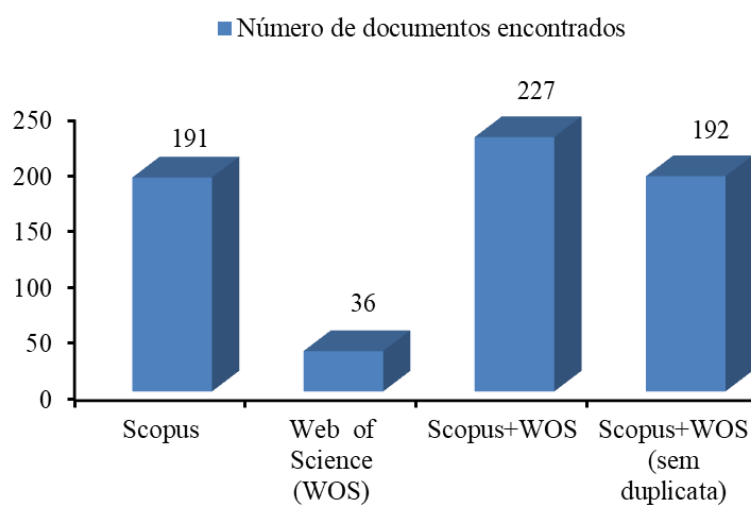
## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Dados encontrados nas bases de pesquisas**

Inicialmente na primeira e na segunda pesquisa foram encontrados na base Scopus 191 e 76 documentos, respectivamente. Já na base WOS o número de documentos foram 36 e 31, respectivamente. Após reuni-los em uma única pasta, foi executada a exclusão das duplicatas (documentos presentes nas duas bases) por meio do gerenciador de bibliografia EndNote para ambos os levantamentos (1º e 2º), onde após esse procedimento foram obtido 192 e 77 arquivos (FIGURA 2.1 e 2.2).

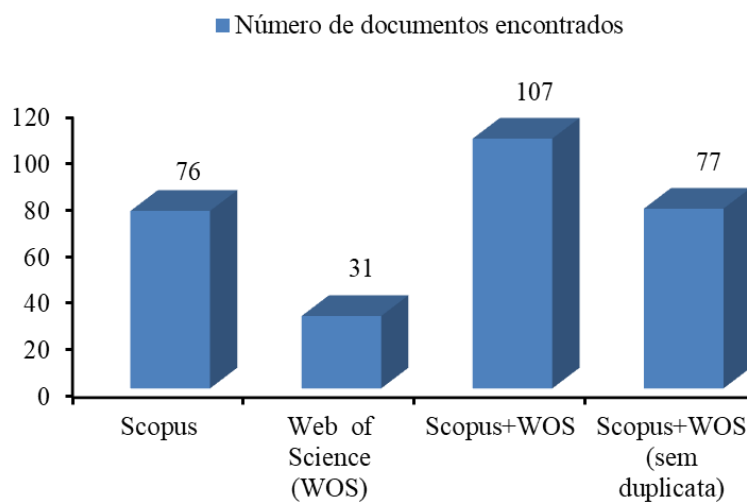


Figura 2.1 — Documentos encontrados nas bases Scopus e Web Of Science (WOS) no primeiro levantamento bibliográfico.



Fonte: Do autor, 2019.

Figura 2.2 — Documentos encontrados nas bases Scopus e Web Of Science (WOS) no segundo levantamento bibliográfico.



Fonte: Do autor, 2019.

### 3.2 Efeito dos fungos micorrízicos no cultivo de plantas medicinais

Os 62 artigos encontrados na pesquisa para os efeitos dos fungos micorrízicos nas plantas medicinais estão distribuídos na linha temporal de 15 anos conforme demonstrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 — Resultado da revisão por ano de publicação dos 62 artigos encontrados.

| <b>Ano de Publicação</b> | <b>Nº de Artigos Publicados</b> |
|--------------------------|---------------------------------|
| 1991                     | 01                              |
| 2000                     | 01                              |
| 2004                     | 01                              |
| 2006                     | 02                              |
| 2007                     | 02                              |
| 2008                     | 01                              |
| 2009                     | 01                              |
| 2010                     | 02                              |
| 2011                     | 06                              |
| 2012                     | 06                              |
| 2013                     | 07                              |
| 2014                     | 04                              |
| 2015                     | 13                              |
| 2016                     | 07                              |
| 2017                     | 08                              |

Fonte: Do autor, 2019.

Dentre as espécies de fungos mais utilizados nas pesquisas nos últimos 15 anos foram encontrados sete gêneros (TABELA 2.2), sendo o *Glomus* presente em maior número de espécies citadas (sete vezes), seguido dos *Acaulospora*, *Funneliformis* e *Rhizophagus* (duas), e *Gigaspora*, *Scutellosporae* e *Sclerocystis*, ambos com apenas uma espécie citada.

Tabela 2.2 — Gêneros e espécies de fungos micorrízicos arbusculares utilizados ao longo dos 15 anos de estudos.

| Gênero               | Espécies  |
|----------------------|---|
| <i>Acaulospora</i>   | <i>Acaulospora</i> spp., <i>Acaulospora scrobiculata</i> .  |
| <i>Funneliformis</i> | <i>Funneliformis mosseae</i> (syn. <i>Glomus mosseae</i> ), <i>Funneliformis inoculadas</i> .   |
| <i>Gigaspora</i>     | <i>Gigaspora margarita</i> .  |
| <i>Glomus</i>        | <i>Glomus aggregatum</i> , <i>Glomus fasciculatum</i> , <i>Glomus geosporum</i> , <i>Glomus microcarpum</i> , <i>Glomus caledônio</i> , <i>Glomus clarum</i> , <i>Glomus etunicatum</i> . |
| <i>Rhizophagus</i>   | <i>Rhizophagus intraradices</i> (syn. <i>Glomus intraradices</i> ), <i>Rhizophagus mosséas</i> .  |
| <i>Scutellospora</i> | <i>Scutellosporas</i> sp.   |
| <i>Sclerocystis</i>  | <i>Sclerocystis sinuos</i> .  |

Fonte: Do autor, 2019.

Dos 62 artigos selecionados, 42 (67,8%) deles demonstraram que os fungos micorrízicos influenciam significativamente no crescimento e/ou óleo essencial das plantas medicinais, ou seja, promoveram um melhor desenvolvimento do vegetal e um óleo essencial de qualidade. Um dos casos foi o trabalho realizado por Keramati et al. (2016), no qual os autores constataram que os fungos aumentaram concomitantemente a biomassa e a produção de óleo essencial da espécie *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae).

Outro ponto observado foi em relação ao estímulo de estresse, 4 trabalhos (6,5%) confirmaram que os fungos micorrízicos estimularam o crescimento radicular das espécies medicinais quando submetidas ao estresse hídrico, condicionando ao vegetal uma melhor absorção de água e nutrientes. No caso da espécie *Foeniculum vulgare* Mill. o fungo *Funneliformis mosseae* foi mais eficiente sob o estresse do déficit de água, sendo que sua aplicação pode ser crítica no cultivo dessa espécie em condições áridas e semi-áridas, para melhorar o crescimento e rendimento da planta (GHEISARI ZARDAK et al., 2017).

Já em estudos *in vitro*, três pesquisas (4,8%) sancionaram que esses tipos de fungos proporcionaram um melhor desempenho dos explantes durante seu crescimento, bem como uma melhor adaptação durante a fase de aclimatização, proporcionando aumento do teor de metabólitos secundários. Um dos resultados encontrados foi a pesquisa executada por Yadav et al. (2013), que constataram que a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares adequados durante o período inicial da fase de aclimatação mostrou efeitos estimuladores para alcançar um melhor crescimento e sobrevivência de plântulas micropropagadas.

Em relação à qualidade do solo, três pesquisas (4,8%) elucidaram que os fungos micorrízicos melhoram a sua estrutura física, como a estabilidade e agregação. Segundo Guo et al. (2006), os fungos micorrízicos podem promover a absorção nutricional, melhorar a função, diversidade e atividade de microrganismo na rizosfera de *Atractylodes lancea* e também influenciar a composição da matéria orgânica, que contribuem para o crescimento da espécie..

Foram encontrados oito artigos (12,9%) que objetivaram identificar os fungos presentes nos sistemas radiculares de espécies medicinais, sendo que, a maioria relata a presença de fungos micorrízicos arbusculares, evidenciando que essa simbiose ocorre de forma natural. No estudo de Karagiannidis et al. (2010) em todas as plantas foram encontrados fungos micorrízicos, incluindo *Achillea coarctata* Poir., *Micromeria juliana* (L.) Bentham ex Reichenb., e *Salvia sclarea* L.

Em se tratando de efeitos adversos, ou seja, aqueles em que os fungos não influenciaram positivamente o crescimento ou rendimento do óleo essencial em plantas medicinais, foram encontrados apenas dois artigos (3,2%). Nesses trabalhos, não foram obtidos efeitos benéficos dos fungos em simbiose com as espécies estudadas. Porém é importante frisar, que estes foram casos específicos e raramente encontrados nos estudos com fungos micorrízicos em comparação com as diversas implicações benéficas que esses microrganismos promovem nos vegetais. Silva e Silva (2017) confirmaram que a associação micorrízica não beneficiou o processo de crescimento e/ou a produção de compostos secundários na espécie *Mimosa tenuiflora* (Wild.), demonstrando que a tecnologia micorrízica nem sempre é uma alternativa para aumentar a produção de moléculas de metabolismo secundário das plantas.

Por meio da Tabela 2.3 observar-se os principais benefícios entre os fungos micorrízicos arbusculares e as plantas medicinais. Nota-se que a maioria dos estudos realizados demonstraram resultados positivos, comprovando que o uso desse fator biótico pode ser aplicado no cultivo das espécies medicinais.

Tabela 2.3 — Porcentagem dos artigos encontrados em relação aos efeitos dos fungos micorrízicos nas plantas medicinais.

| <b>Efeito dos Fungos Micorrízicos</b> | <b>Número encontrado e % em relação ao total de artigos</b> |
|---------------------------------------|---|
| Crescimento e/ou óleo essencial       | 42 (67,8%)  |
| Estresse hídrico                      | 4 (6,5%)  |
| Melhor desempenho (Aclimatização)     | 3 (4,8%)  |
| Estrutura do solo                     | 3 (4,8%)  |
| Presença no sistema radicular         | 8 (12,9%)   |
| Efeitos adversos                      | 2 (3,2%)  |
| <b>Total</b>                          | <b>100%</b>   |

Fonte: Do autor, 2019.

### 3.3 Efeito dos fungos micorrízicos na produção de metabólitos secundários

Para o 2º levantamento bibliográfico, a linha temporal ficou distribuída em um período de 12 anos, conforme os 41 artigos encontrados na pesquisa para os efeitos dos fungos micorrízicos nos compostos químicos das plantas medicinais (TABELA 2.4).

Tabela 2.4 — Resultado da revisão por ano de publicação dos 41 artigos encontrados.

| <b>Ano de Publicação</b> | <b>Nº de Artigos Publicados</b> |
|--------------------------|---------------------------------|
| 2004                     | 1                               |
| 2006                     | 1                               |
| 2007                     | 1                               |
| 2008                     | 1                               |
| 2010                     | 3                               |
| 2011                     | 3                               |
| 2012                     | 3                               |
| 2013                     | 6                               |
| 2014                     | 4                               |
| 2015                     | 9                               |
| 2016                     | 1                               |
| 2017                     | 8                               |

Fonte: Do autor, 2019.

Neste caso, conforme as pesquisas realizadas nos 41 artigos, 37 (90,24%) deles apresentaram resultados positivos em relação ao crescimento e/ou na produção de metabólitos secundários. Dentre os trabalhos selecionados, Weisany et al. (2017) observou que os

conteúdos de éter, limoneno, carvona, iso-dihidrocarvona, miristicina, p-cimeno, decanal, 2-decenal e n-di-hidrocarvona foram melhorados em óleos essenciais obtidos de plantas colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares, comprovando que esse fator biótico pode interferir de maneira benéfica nesse processo.

Também foram encontrados quatro artigos (9,76%), que verificaram a presença de fungos micorrízicos em espécies de plantas medicinais no seu habitat natural. Dentre as pesquisas realizadas, Zubek e Błaszowski (2009) encontraram 15 espécies de fungos micorrízicos arbusculares em 30 espécies de plantas medicinais.

Na Tabela 2.5 estão representadas algumas espécies de fungos micorrízicos e plantas medicinais, tal como, determinados compostos químicos de suas respectivas espécies vegetais, encontrados durante esses 12 anos de estudos.

Tabela 2.5 — Espécies de fungos, plantas medicinais e alguns compostos químicos encontrados no decorrer dos 12 anos de estudos.

| <b>Espécies de fungos</b>   | <b>Espécies medicinais</b>   | <b>Compostos químicos</b>   | <b>Autores</b>                      |
|---|--|---|-------------------------------------|
| <i>G.clarum</i> , <i>G.etunicatum</i> , <i>G.margarita</i> e <i>G.scrobiculata</i> A.     | <i>Mentha arvensis</i> L   | Mentol  | Freitas, Martins e Vieira, (2004)   |
| <i>Funneliformis mosseae</i> (syn. <i>Glomus mosseae</i> )                                | <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb)   | Óleo essencial  | Guo et al. (2006)                   |
| <i>Rhizophagus irregularis</i> e <i>G. caledonium</i> e <i>F. mosseae</i>                 | <i>Ocimum basilicum</i> L  | Ácidos rosmarínico e cafeico  | Toussiant, Smith e Smith, (2007)    |
| <i>Glomus</i> , <i>Acaulospora</i> , <i>Gigaspora</i> e <i>Scutellospora</i>              | <i>Catharanthus roseus</i> L   | Vimblastina   | De La Rosa-Mera et al. (2012)       |
| <i>Rhizophagus irregulares</i>  | <i>Arnica montana</i> L  | Ácidos fenólicos e lactonas sesquiterpênicas  | Jurkiewicz et al. (2010)            |
| <i>Rhizophagus</i> , <i>Glomus</i> e <i>Funneliformis</i>                                 | <i>Hypericum perforatum</i> L  | Hipericina e pseudo-hiperperina   | Zubek, Błaszowski e Buchwald (2012) |
| <i>Funneliformis mosseae</i> e <i>Rhizophagus irregulares</i>                             | <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench   | Fenóis, flavonóides e taninos totais  | Sun e Tang, (2013)                  |
| <i>Funneliformis mosseae</i> e <i>Septoglomus viscosum</i> (syn. <i>Glomus viscosum</i> ) | <i>Salvia officinalis</i> L., <i>Origanum vulgare</i> L., e <i>Thymus vulgaris</i> L | Manol ( <i>S.officinalis</i> ); Timol ( <i>T.vulgaris</i> ); Carvacrol ( <i>O.vulgare</i> ) | Tarraf et al. (2015)                |

Fonte: Do autor, 2019.

Na Tabela 2.6 são apresentados os resultados obtidos nos artigos selecionados ao longo dos estudos com fungos micorrízicos, em que os mesmos demonstraram resultados

bastantes promissores, pois fica evidente os efeitos benéficos proporcionados por esses microrganismos em simbiose com plantas medicinais.

Tabela 2.6 — Influência dos fungos micorrízicos nas plantas medicinais no decorrer dos 12 anos de estudos (continua).

| Título  | Efeito dos fungos micorrízicos  | Autores                            |
|---|---|------------------------------------|
| Yield and Quality of essential oils of <i>Mentha arvensis</i> in response to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi                  | A maior produção de óleo essencial e mentol foram encontradas em plantas inoculadas com <i>A. scrobiculata</i>  | Freitas, Martins e Vieira, (2004)  |
| Effects of arbuscular mycorrhizae on growth and essential oil of <i>Atractylodes lancea</i>   | As micorrizas arbusculares podem promover a absorção de nutrientes, melhorar a diversidade e atividade de microorganismo na rizosfera e influenciar a composição da matéria orgânica, que induziram ao crescimento de <i>A. lancea</i>                          | Guo et al. (2006)                  |
| Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition                | Os fungos micorrízicos apresentam uma alternativa potencial de promover o crescimento desta importante erva medicinal ( <i>Ocimum basilicum</i> ), pois os modos naturais de crescimento dessas culturas são atualmente muito procurados na indústria de ervas  | Toussaint, Smith e Smith, (2007)   |
| Arbuscular mycorrhizal (AM) technology for the conservation of <i>Curculigo orchioides</i> Gaertn.: An endangered medicinal herb            | O consórcio misto de FMA apresentaram os melhores parâmetros avaliados. O estudo sugere o uso de consórcios mistos de fungos AM em culturas monoespecíficas para cultivo sustentável e conservação de plantas medicinais ameaçadas: <i>Curculigo orchioides</i> | Sharma, Kapoor e Bhatnagar, (2008) |
| Optimization of culture conditions of <i>Arnica montana</i> L.: Effects of mycorrhizal fungi and competing plants                           | A arnica pode manter um desempenho fotossintético que permitia a sobrevivência somente na presença de FMA; Sem FMA, o desempenho fotossintético foi menor   | Jurkiewicz et al. (2010)           |
| Arbuscular mycorrhizal fungi and potassium bicarbonate enhance the foliar content of the vinblastine alkaloid in <i>Catharanthus roseus</i> | A aplicação combinada de NaCl e KHCO <sub>3</sub> diminuiu significativamente a colonização de FMA nas raízes. A inoculação de FMA ou a aplicação de 7,5 mM de KHCO <sub>3</sub> induziu o acúmulo de vinblastina em folhas de vinca                            | De La Rosa-Mera et al. (2011)      |



Tabela 6— Influencia dos fungos micorrízicos nas plantas medicinais no decorrer dos 12 anos de estudos (continua).

| Ano  | Título  | Efeito dos fungos micorrízicos   | Autores                             |
|------|---|--|-------------------------------------|
| 2012 | Isolation of arbuscular mycorrhizal fungi consortia from medicinal plants and their effectiveness on growth of vinca ( <i>Catharanthus roseus</i> )                     | Após 70 dias, apesar de apresentar apenas um gênero FMA predominante ( <i>Glomus</i> ), o consórcio isolado de <i>R. mexicanus</i> mostrou efeitos mais consistentes sobre o crescimento de <i>C. roseus</i> (número de folhas, área foliar e peso seco da folha) quando comparado ao consórcios de micorrizas restantes | De La Rosa-Mera et al. (2012)       |
| 2013 | Effect of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on root traits and root volatile organic compound emissions of <i>Sorghum bicolor</i>                                | Os FMA podem alterar o perfil de COVs emitidos pelas raízes, bem como a morfologia das raízes das plantas de sorgo, indicando que os FMA têm o potencial de ajudar as plantas a se adaptarem e alterar os ambientes do solo  | Sun e Tang (2013)                   |
| 2014 | Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of <i>Stevia rebaudiana</i> | A combinação de fungos micorrízicos e elicitores bióticos pode aumentar o crescimento e o teor de esteviosídeos em plantações regeneradas de cultura de tecidos  | Vafadar, Amooaghaie e Otrshy (2014) |
| 2015 | Effects of mycorrhiza on growth and essential oil production in selected aromatic plants  | A inoculação micorrízica pode ser uma tecnologia promissora no sistema agrícola sustentável para melhorar o desempenho da produtividade da planta. Inóculos específicos são estratégicos para melhorar o perfil químico dos óleos essenciais   | Tarraf et al. (2015)                |
| 2016 | Arbuscular mycorrhizal fungi induced changes in rhizosphere, essential oil and mineral nutrients uptake in dill/common bean intercropping system                        | Em todos os sistemas de cultivo, a colonização AM melhorou o peso seco e os teores de P, K, Fe, Zn e Mn das plantas de aneto. A comunidade bacteriana cultivável também foi aumentada no consórcio de enxame / feijoeiro. O rendimento de óleo essencial foi melhorado como resultado da colonização MA e intercalação   | Weisany et al. (2016)               |

Tabela 6— Influencia dos fungos micorrízicos nas plantas medicinais no decorrer dos 12 anos de estudos (conclusão).

| Ano  | Título   | Efeito dos fungos micorrízicos  | Autores                       |
|------|--|---|-------------------------------|
| 2017 | Responses of field grown fennel ( <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.) to different mycorrhiza species under varying intensities of drought stress | Os dados apresentados neste estudo sugerem que diferentes espécies de fungos MA, mesmo dentro do mesmo gênero, têm efeitos distintos sobre o crescimento e o rendimento do funcho. Em geral, os resultados mostraram que <i>G. mosseae</i> era mais eficiente sob o estresse do déficit de água. A aplicação de fungos MA pode ser crítica no cultivo de erva-doce em condições áridas e semi-áridas, onde a água é o fator mais importante na determinação do crescimento e rendimento da planta | Gheisari Zardak et al. (2017) |

FM: Fungos micorrízicos; FMA: Fungos Micorrízicos Arbusculares; MA: Micorrizas Arbusculares.

Fonte: Do autor, 2019.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Por meio desta pesquisa de revisão, pode-se concluir que os fungos micorrízicos arbusculares em simbiose com as plantas medicinais, influenciam significativamente de maneira benéfica, tanto no crescimento do vegetal como no teor, rendimento e qualidade do óleo essencial e em seus metabólitos secundários, confirmando que esse tipo de microrganismo pode ser considerado uma estratégia sustentável para o cultivo de espécies medicinais.

## REFERÊNCIA

- AMIRI, R. et al. Nutritional status, essential oil changes and water-use efficiency of rose geranium in response to arbuscular mycorrhizal fungi and water deficiency stress. **Symbiosis**, v. 73, n. 1, p. 15-25, Sep 2017.
- BAHONAR, A. et al. Quantitative and qualitative changes of Rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) in response to mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) inoculation under saline environments. **Journal of Medicinal Plants**, v. 15, n. 57, p. 25-37, 2016.
- BAHTIYARCA BAGDAT, R.; CRAKER, L. E.; YUKSEL, K. The effect of fertilization and Mycorrhiza inoculation on yield variables and essential oil characteristics of *Salvia officinalis* L. growing in the greenhouse and at the field. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 51, n. 3, p. S341-S348, 2017.
- BERBARA, R. L. L; Souza, F. A; Fonseca, H. M. A. C. III - Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. **Nutrição mineral de plantas**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, p. 54-84, 2006.
- BERUDE, M. C. et al. Micorrizas e Sua Importância Agroecológica. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer-Goiânia, v. 11, n. 22, p. 132-146, 2015.
- BURNI, T.; HUSSAIN, F.; SHARIF, M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on essential oils of two pharmaceutically important mentha species in marginal soils. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 1, p. 293-296, Feb, 2013.
- BHARTI, N. et al. Integrated application of Exiguobacterium oxidotolerans, Glomus fasciculatum, and vermicompost improves growth, yield and quality of Mentha arvensis in salt-stressed soils. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 717-728, 2016.
- CAMPRUBI, A. et al. Field Performance and Essential Oil Production of Mycorrhizal Rosemary in Restoration Low-Nutrient Soils. **Land Degradation & Development**, v. 26, n. 8, p. 793-799, Nov 2015.
- CARREÓN-ABUD, Y. et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases the content of volatile terpenes and plant performance in *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 14, n. 4, p. 273-279, 2015.
- DE LA ROSA-MERA, C. J. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and potassium bicarbonate enhance the foliar content of the vinblastine alkaloid in Catharanthus roseus. **Plant and Soil**, v. 349, n. 1-2, p. 367-376, 2011.
- DE LA ROSA-MERA, C. et al. Isolation of arbuscular mycorrhizal fungi consortia from medicinal plants and their effectiveness on growth of vinca (Catharanthus roseus). **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 85, n. 2, p. 187-198, 2012.
- DOVANA, F. et al. Effect of a non-mycorrhizal endophyte isolated from Mentha piperita on in vitro culture of *Ocimum basilicum* cuttings. **Acta Horticulturae**. OZUDOGRU, E. A. e BERUTO, M.: International Society for Horticultural Science. 1155: 557-563 p. 2017.

- FALLAHI, H. R. et al. Qualitative response of roselle to planting methods, humic acid application, mycorrhizal inoculation and irrigation management. **Journal of Crop Improvement**, v. 31, n. 2, p. 192-208, 2017.
- FREITAS, M. S. M.; MARTINS, M. A.; VIEIRA, I. J. C. Yield and Quality of essential oils of *Mentha arvensis* in response to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 887-894, 2004.
- GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.
- GUO, L. P. et al. Effects of arbuscular mycorrhizae on growth and essential oil of *Atractylodes lancea*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 31, n. 18, p. 1491-1496, 2006.
- GUPTA, M. L. et al. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *ocimum* spp. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 7, n. 2, p. 57-63, 2000.
- GUPTA, R.; SINGH, A.; PANDEY, R. Microbe-based technology ameliorates glandular trichomes, secondary metabolites and antioxidants in *Pelargonium graveolens* L'Hér. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p. 4151-4159, 2016.
- GHEISARI ZARDAK, S. et al. Responses of field grown fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) to different mycorrhiza species under varying intensities of drought stress. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 5, p. 16-25, 2017.
- HAZZOUMI, Z. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and water stress on growth, phenolic compounds, glandular hairs, and yield of essential oil in basil (*Ocimum gratissimum* L). **Applied Adhesion Science**, v. 3, n. 1, 2015.
- HAZZOUMI, Z. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and water stress on growth, phenolic compounds, glandular hairs, and yield of essential oil in basil (*Ocimum gratissimum* L). **Applied Adhesion Science**, v. 4, n. 1, 2016.
- HEYDARIZADEH, P. et al. Mycorrhizal infection, essential oil content and morpho-phenological characteristics variability in three mint species. **Scientia Horticulturae**, v. 153, p. 136-142, 2013.
- INVAM. **International culture collection of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi**. Disponível em: <<https://invam.wvu.edu/>> acesso em: 31 de mar. 2019.
- JUGRAN, A. K. et al. The effect of inoculation with mycorrhiza: Am on growth, phenolics, tannins, phenolic composition and antioxidant activity in *Valeriana jatamansi* jones. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 1036-1049, 2015.
- JURKIEWICZ, A. et al. Optimization of culture conditions of *Arnica montana* L.: Effects of mycorrhizal fungi and competing plants. **Mycorrhiza**, v. 20, n. 5, p. 293-306, 2010.
- KARAGIANNIDIS, N. et al. Essential oil content and composition, nutrient and mycorrhizal status of some aromatic and medicinal plants of Northern Greece. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 5, p. 823-830, 2010.
- KERAMATI, S. et al. Essential oil composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) in symbiotic relationship with piriformospora indica and paclobutrazol application under salt

stress. **Acta Biologica Hungarica**, v. 67, n. 4, p. 412-423, 2016.

LAZZARA, S. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi altered the hypericin, pseudohypericin, and hyperforin content in flowers of *Hypericum perforatum* grown under contrasting P availability in a highly organic substrate. **Mycorrhiza**, v. 27, n. 4, p. 345-354, 2017.

LERMEN, C; MOHR, F. B. M; ALBERTON, O. Growth of *Cymbopogon citratus* inoculated with mycorrhizal fungi under different levels of lead. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 239-246, 2015.

LERMEN, C. et al. Essential oil content and chemical composition of *Cymbopogon citratus* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of lead. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 734-738, Dec 2015.

LIMA, C. S; CAMPOS, M. A. S; DA SILVA, F. S. B. Mycorrhizal Fungi (AMF) increase the content of biomolecules in leaves of *Inga vera* Willd. seedlings. **Symbiosis**, v. 65, n. 3, p. 117-123, 2015.

LIMA, C. S. et al. Mycorrhizal symbiosis increase the level of total foliar phenols and tannins in *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett seedlings. **Industrial Crops and Products**, v. 104, p. 28-32, 2017.

MALIK, A. A. et al. Effect of inorganic and biological fertilizer treatments on essential oil composition of *Ruta graveolens* L. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 18, n. 2, p. 191-202, 2012.

MORELLI, F. et al. Antimicrobial activity of essential oil and growth of *Ocimum basilicum* (L.) inoculated with mycorrhiza and humic substances applied to soil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 11, Jul 2017.

NELL, M. et al. Root colonization by symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi increases sesquiterpenic acid concentrations in *Valeriana officinalis* L. **Planta Medica**, v. 76, n. 4, p. 393-398, 2010.

OLIVEIRA, M. S.; CAMPOS, M. A.; SILVA, F. S. Arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost to maximize the production of foliar biomolecules in *Passiflora alata* Curtis seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 3, p. 522-528, 2014.

PADMAVATHI, T.; RANJINI, R. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of *Ocimum sanctum* and glomalin a soil related protein. **Research Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 44-50, 2011.

PEDONE-BONFIM, M. V. L. et al. Mycorrhizal technology and phosphorus in the production of primary and secondary metabolites in cebil (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 6, p. 1479-1484, Apr 2013.

PEDONE-BONFIM, M. V. L.; DA SILVA, F. S. B.; MAIA, L. C. Production of secondary metabolites by mycorrhizal plants with medicinal or nutritional potential. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 2, 2015.

- RAGHUWANSHI, R.; SINHA, S. Linking mycorrhizal technology with medicinal plant secondary metabolites. In: (Ed.). **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**: Springer India, p.121-132. 2014.
- RICHTER, J. et al. Effects of mycorrhization on amount and composition of essential oils of marjoram (*Majorana Hortensis*), caraway (*Carum carvi* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). In: (Ed.). **Renewable Resources and Plant Biotechnology**: Nova Science Publishers, Inc, p.93-106. 2006.
- RICHTER, J. et al. Impact of arbuscular mycorrhiza on the St. John's wort (*Hypericum perforatum*) wilt disease induced by *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 118, n. 3-4, p. 109-118, 2011.
- SAWILSKA, A. K.; JENDRZEJCZAK, E. Efficiency of Sandy Everlasting [*Helichrysum arenarium* (L.) Moench] cultivation from in vitro seedlings and achenes. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 50-55, 2013.
- SILVA, F. A da; SILVA, F. S. B da. Is the application of arbuscular mycorrhizal fungi an alternative to increase foliar phenolic compounds in seedlings of *Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir., Mimosoideae. **Journal Revista Brasileira de Botanica**. v. 40, p. 361-365, 2017.
- SOUZA, A. V. et al. Michorrhizal fungi studies in catuaba (*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza), a medicinal plant from the Cerrado region at risk of extinction. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. SUPPL. 1, p. 646-654, 2014.
- SUN, X. G; TANG, M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on root traits and root volatile organic compound emissions of *Sorghum bicolor*. **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 373-379, Sep 2013.
- SHARMA, D.; KAPOOR, R.; BHATNAGAR, A. K. Arbuscular mycorrhizal (AM) technology for the conservation of *Curculigo orchioides* Gaertn.: An endangered medicinal herb. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 395-400, 2008.
- SHUBIN, L. et al. Fungal endophytes of alpinia officinarum rhizomes: Insights on diversity and variation across growth years, growth sites, and the inner active chemical concentration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 2014.
- SNA. **Sociedade Nacional de Agricultura**. Disponível em: <<http://sna.agr.br/oleos-essenciais-uma-fonte-de-divisas-a-ser-mais-explorada-no-brasil/>> Acessado em: 21 de Ago. de 2017.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª Ed. Artmed Edit, p. 136-139, 2017.
- TANVIR, B.; HUSSAIN, F. Diversity in arbuscular mycorrhizal morphology in some medicinal plants of family Lamiaceae. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 3, p. 1789-1792, 2011.
- TARRAF, W. et al. Effects of mycorrhiza on growth and essential oil production in selected aromatic plants. **Italian Journal of Agronomy**, v. 10, n. 3, p. 160-162, 2015.
- TOUSSAINT, J. P.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 4, p. 291-297, 2007.

URCOVICHE, R. C. et al. Plant growth and essential oil content of *Mentha crispa* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of phosphorus. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 103-107, 2015.

VAFADAR, F.; AMOOAGHAIE, R.; OTROSHY, M. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 128-136, 2014.

YADAV, K.; AGGARWAL, A.; SINGH, N. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced acclimatization, growth enhancement and colchicine content of micropropagated *Gloriosa superba* L. plantlets. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 88-93, 2013.

YUAN, Z. L.; CHEN, Y. C.; MA, X. J. Symbiotic fungi in roots of artemisia annua with special reference to endophytic colonizers. **Plant Biosystems**, v. 145, n. 2, p. 495-502, 2011.

WEI, G; WANG, H. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient uptake and synthesis of volatile oil in *Schizonepeta tenuifolia* briq. **Zhongguo zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica**, v. 16, n. 3, p. 139-142, 189, 1991.

WEISANY, W.; RAEI, Y.; PERTOT, I. Changes in the essential oil yield and composition of dill (*Anethum graveolens* L.) as response to arbuscular mycorrhiza colonization and cropping system. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 295-306, 2015.

WEISANY, W. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi induced changes in rhizosphere, essential oil and mineral nutrients uptake in dill/common bean intercropping system. **Annals of applied biology**, v. 169, n. 3, p. 384-397, 2016.

WEISANY, W. et al. *Funneliformis mosseae* fungi changed essential oil composition in *Trigonella foenumgraecum* L., *Coriandrum sativum* L. and *Nigella sativa* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 3, p. 276-287, 2017.

ZARDAK, S. G. et al. Responses of field grown fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) to different mycorrhiza species under varying intensities of drought stress. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 5, p. 16-25, May 2017.

ZENG, Y. et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and perspectives. **Mycorrhiza**, v. 23, n. 4, p. 253-265, May 2013.

ZUBEK, S.; BŁASZKOWSKI, J. Medicinal plants as hosts of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, n. 3, p. 571-580, 2009.

ZUBEK, S; BŁASZKOWSKI, J; MLECZKO, P. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte associations of medicinal plants. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 80, n. 4, p. 285-292, 2011.

ZUBEK, S; BŁASZKOWSKI, J; BUCHWALD, W. Fungal root endophyte associations of medicinal plants. **Nova Hedwigia**, v. 94, n. 3-4, p. 525-540, 2012.

ZUBEK, S.; MIELCAREK, S.; TURNAU, K. Hypericin and pseudohypericin concentrations



of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 22, n. 2, p. 149-156, 2012.

ZUBEK, S. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil microbial communities under contrasting fertilization of three medicinal plants. **Applied Soil Ecology**, v. 59, p. 106-115, 2012.

ZUBEK, S. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi abundance, species richness and composition under the monocultures of five medicinal plants. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v. 12, n. 5, p. 127-141, 2013.

ZUBEK, S. et al. Enhanced concentrations of elements and secondary metabolites in *Viola tricolor* L. induced by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v. 390, n. 1-2, p. 129-142, May 2015.

ZHANG, H. H. et al. Effects of a dark-septate endophytic isolate LBF-2 on the medicinal plant *Lycium barbarum* L. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 91-96, 2012.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 1266-1271, 2007.

ZHU, Z. B. et al. The growth and medicinal quality of *Epimedium wushanense* are improved by an isolate of dark septate fungus. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 9, p. 1344-1351, 2015.

**CAPÍTULO III**  
**INFLUÊNCIA DOS FUNGOS MICORRIZÍCOS ARBUSCULARES E DO ESTERCO**  
**BOVINO NO CRESCIMENTO E NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO**  
**ESSENCIAL DE *Melissa officinalis* L. (LAMIACEAE)**

## RESUMO

A erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) é uma planta medicinal amplamente conhecida por suas diversas propriedades, tais como: antidepressivas, antitumorais, antileishmania, antitripanosoma, gastroprotetor e antioxidantes. Vários fatores bióticos e abióticos podem afetar a produção vegetal e metabolitos na planta. Objetivou-se observar a influência dos FMAs e da adubação bovina no crescimento e na composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. O experimento foi desenvolvido, em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras-UFLA. O substrato utilizado foi composto de Latossolo vermelho distrófico de textura argilosa e areia na proporção de 2:1 (solo:areia), sendo adicionado 16,2 kg de esterco bovino. O mix de fungos micorrízicos inoculados foi composto pelas seguintes espécies: *Scutellospora heterogama*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Acaulospora morrowiae*. O arranjo experimental foi organizado em Delineamento Inteiramente Casualizado - DIC em esquema fatorial 2 x 2 (com/sem fungos – CF/SF; com/sem esterco – CE/SE) totalizando quatro tratamentos T1 (SFSE), T2 (SFCE), T3 (CFSE) e T4 (CFCE). Após 90 dias foram realizadas a contagem da densidade de esporos e a colonização das raízes, bem como matéria seca das folhas (MSF), matéria seca dos caules (MSC), matéria seca das raízes (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca total (MST), razão parte aérea/raiz (PA/R) e área foliar total (AFT). A extração do óleo essencial foi por meio do processo de hidrodestilação em aparelho modificado de Clevenger. Os tratamentos inoculados com FMAs (CFSE e CFCE) demonstraram taxas de porcentagem de infecção significativamente superior 46,2 e 43,6%, respectivamente, quando comparados com os sem inoculação (SFSE e SFCE) 23,1 e 29,6%, respectivamente. O tratamento CFSE (19,0 cm) foi significativamente maior do que o controle SFSE (16,6 cm). A inoculação dos fungos micorrízicos arbusculares foi de significativa para o ganho de matéria seca. Observou-se que a maior média do constituinte principal do óleo essencial ocorreu na presença da simbiose (CFSE), com 72,09%. Já o sem inoculação (SFSE) apresentou a menor média com 71,76%. Desta forma percebe-se que o uso dos FMAs e do esterco bovino influenciam na produção de biomassa seca, teor, rendimento e nos constituintes químicos do óleo essencial de *M. officinalis* L. sugerindo que a combinação dessas práticas no cultivo dessa espécie pode potencializar a produção, proporcionando maior rendimento de matéria seca e elevado teor de princípio ativo.

**Palavras chaves:** Colonização. Metabólito secundário. Citral.

## ABSTRACT

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) is a medicinal plant widely known for its various properties, such as antidepressants, antitumor, anti-Leishmania, anti-trypanosomal, gastroprotective and antioxidants. Several biotic and abiotic factors can affect plant production and metabolites in the plant. The objective of this experiment was to observe the influence of AMFs and bovine fertilization on the growth and chemical composition of the essential oil of *Melissa officinalis* L. The experiment was carried out in a greenhouse at the Laboratory of Tissue Culture of the Federal University of Lavras - UFLA. The substrate used was composed of a dystrophic Red Latosol of clayey texture and sand in the proportion of 2:1 (soil: sand), being added 16,2 kg of bovine manure. The mixture of mycorrhizal fungi was composed by the following species: *Scutellospora heterogama*, *Claroideoglosum etunicatum*, and *Acaulospora morrowiae*. The experimental arrangement was organized in a completely randomized design (DIC) in a 2 x 2 factorial scheme (with / without fungi - CF / SF, with / without manure - CE / SE), totalizing four treatments T1 (SFSE), T2 (SFCE), T3 (CFSE) e T4 (CFCE). After 90 days, spore density and root colonization were counted, as well as leaf dry matter (MSF), stem dry matter (MSC), root dry matter (MSR), dry matter of the aerial part (MSPA), total dry matter (MST), aerial part/root ratio (PA/R) and total leaf area (AFT). The extraction of the essential oil was by the hydrodistillation process in a Clevenger modified apparatus. The treatments inoculated with AMFs (CFSE and CFCE) showed significantly higher rates of infection 46,2 and 43,6%, respectively, when compared to those without inoculation (SFSE and SFCE) 23,1 and 29,6%, respectively. The CFSE treatment (19,0 cm) was significantly higher than the SFSE control (16,6 cm). The presence of arbuscular mycorrhizal fungi was extremely important for the dry matter gain since it presented significantly higher averages. It was observed that the highest mean of the main constituent occurred in the presence of symbiosis (CFSE), with 72,09%. On the other hand, the non-inoculation treatment (SFSE) presented the lowest average with 71,76%. Thus, the use of FMA and bovine manure influences the production of dry biomass, content, yield and the chemical constituents of the essential oil of lemon balm suggesting that the combination of these practices in the cultivation of this species can potentiate the production, providing higher yield of dry matter and high content of active principle.

**Keywords:** Colonization. Secondary metabolite. Citral.

## 1 INTRODUÇÃO

A erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) é uma espécie perene que pertence a família Lamiaceae e é originária do Sul da Europa e da região do mediterrâneo (Kim et al., 2010). É uma planta medicinal amplamente conhecida por suas diversas propriedades medicinais, tais como: antidepressivas, antitumorais, antileishmania, antitripanosoma, gastroprotetor e antioxidantes conforme estudos realizados nos últimos anos (LIN et al., 2015; JAHANBAN-ESFAHLAN et al., 2015; CUNHA et al., 2016; SABERI et al., 2016; SAFAEIAN et al., 2016). Além disso, Giraldi e Hanazaki (2010) afirmam por meio de estudo etnobotânico que a erva-cidreira possui indicações para os sistemas: respiratório, geniturinário e digestório.

O óleo essencial de *M. officinalis* L. é bastante valorizado no mercado. Pesquisas realizadas no site Empório® (2019) constatam que 1kg de folhas secas custa R\$ 40. E o preço de 1 mL de óleo essencial equivale a R\$ 52, 27 (NATURITAS, 2019).

As plantas medicinais são aquelas destinadas a um propósito terapêutico por apresentarem substâncias do metabolismo secundário. Diferentes da maioria das culturas, que se busca alto teor de biomassa, para uma excelente produção de plantas medicinais, foca-se em dois fatores primordiais, que são a matéria seca elevada e alto teor de princípios ativos. Porém, a produção desses princípios ativos (metabólitos secundários) são influenciados por diversos fatores. De Moraes (2009) menciona que os compostos majoritários dos óleos essenciais podem ser alterados por fatores genéticos, técnicos (coleta, estabilização e armazenamento), bióticos ou abióticos, que podem influenciar diretamente na qualidade e, conseqüentemente, nos resultados de tratamentos e de testes biológicos sobre patógenos humanos ou fitopatógenos. Desta forma podemos perceber que a produção de óleos essenciais é afetada diretamente pela interação genótipo/ambiente.

De acordo com o Ministério da Saúde, nos últimos anos entre 2013 e 2015, a procura por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) mais que dobrou: o crescimento foi de 161% (BRASIL, 2016). Nesse contexto de variações na produção de plantas medicinais e para atender essa demanda se faz necessário inovar e desenvolver novas técnicas agrícolas que possam melhorar a qualidade e quantidade de matéria prima vegetal e de seus princípios ativos.

Uma das possibilidades promissoras pode ser o uso dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) durante o cultivo. Os FMAs são bastante difundidos nos ecossistemas do mundo. Moreira e Siqueira (2006) afirmam que esse fenômeno é generalizado na natureza,

visto que 80% das espécies vegetais, incluindo quase todos os gêneros das Gimnospermas e Angiospermas, além de alguns representantes das Briófitas e Pteridófitas, formam esse tipo de micorriza. Ou seja, grande parte dos fungos micorrízicos arbusculares possuem baixa preferencialidade, formando associações com diversas espécies terrestres.

Outra característica a ser considerada desses seres vivos é que eles são biotróficos obrigatórios, ou seja, necessitam de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida (HOFFMANN e LUCENA, 2006). A colonização de raízes por FMAs pode trazer inúmeros benefícios para a planta hospedeira, como: aumento significativo da biomassa (HEITOR et al., 2016), melhora o desempenho do vegetal em ambientes com estresse hídrico (HAZZOUMI et al., 2015), aumenta quantidade de glomalina presente no solo contribuindo para a estabilidade de agregados (PADMAVATHI; RANJINI, 2011), e conforme Weisany et al. (2017), a colonização de FMA também pode melhorar o rendimento de óleo essencial.

Outra prática que pode ser empregada, são os cuidados com a adubação nas plantas medicinais, visto que o estresse causado pela falta ou excesso de nutrientes pode interferir na composição química da planta, aumentando ou diminuindo a produção de fármacos e consequentemente de princípios ativos. (LAMEIRA e PINTO, 2008).

Estudos relatam efeitos positivos na produção de uma forma geral, como: na rizosfera (CHEN, et al., 2018), no aumento dos teores de matéria orgânica (M.O), na diminuição da compactação e elevação da fertilidade nas camadas mais profundas do solo (XU et al., 2017), proporciona significativamente maior comprimento de planta, massa fresca e seca, e rendimento, além de melhorar os compostos fenólicos de determinadas espécies (ALAGHEMAND, et al., 2017; GANJALI e KAYKHAI, 2017).

A partir deste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência dos FMAs e da adubação orgânica no crescimento, no teor, rendimento e na composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (erva-cidreira).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local do experimento e material vegetal**

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras-UFLA, no município de Lavras, situado na região Sul do estado de Minas Gerais, a 918,87 metros de altitude, latitude de 21°14'S e longitude de

45°00'W GRW. De acordo com a classificação climática de Köppen, o clima regional é do tipo Cwa, mas apresenta características de Cwb, com duas estações bem definidas, uma fria e seca, de abril a setembro e outra quente e úmida, de outubro a março (Brasil, 1992).

As exsiccatas da espécie estudada estão depositadas no Herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA e correspondem ao nº 22155. As mudas de erva-cidreira foram produzidas por meio de microestacas apicais de aproximadamente 4-5 cm de comprimento, sendo que as mesmas foram colocadas para enraizar em bandejas de poliestireno de 128 células, contendo substrato comercial Plantmax®. As plântulas ficaram em estufa com 60% de sombreamento e, posteriormente, foram aclimatizadas por meio do aumento gradativo da intensidade luminosa.

## **2.2 Implantação do experimento**

O substrato utilizado foi composto de Latossolo vermelho distrófico de textura argilosa e areia na proporção de 2:1 (solo:areia), sendo adicionado 9 kg.m<sup>-2</sup> de esterco bovino curtido conforme a recomendação de Brant (2008). Este substrato foi esterilizado em autoclave, por um período de uma hora, com temperatura de 120°C sobre uma pressão de 1atm. Após 24h este processo foi repetido. A análise do substrato (solo + esterco) foi realizada no Laboratório de Análises do Solo, do Departamento de Ciência do Solo da UFLA, conforme a metodologia proposta pela Embrapa (2009), e os resultados estão apresentados na (TABELA 3.1).

Tabela 3.1 — Análise química dos substratos usados nos tratamentos para o cultivo de *Melissa officinalis* L.

|                           | Solo sem esterco | Solo com esterco |
|---------------------------|------------------|------------------|
| pH H <sub>2</sub> O       | 6,8              | 7,4              |
| K mg/dm <sup>3</sup>      | 1,87             | 308,6            |
| P mg/dm <sup>3</sup>      | 8,66             | 17,2             |
| Ca cmolc/dm <sup>3</sup>  | 0,10             | 2,71             |
| Mg cmolc/dm <sup>3</sup>  | 0,10             | 0,55             |
| Al cmolc/dm <sup>3</sup>  | 0,04             | 0,03             |
| SB cmolc/dm <sup>3</sup>  | 0,20             | 4,05             |
| T cmolc/dm <sup>3</sup>   | 0,80             | 5,04             |
| t cmolc/dm <sup>3</sup>   | 0,24             | 4,08             |
| H+Al cmol/dm <sup>3</sup> | 0,60             | 0,99             |
| V %                       | 25,6             | 80,4             |
| m %                       | 16,7             | 0,74             |
| M.O dag/Kg                | 0,20             | 2,87             |
| P-Rem mg/L                | 56,3             | 26,4             |

**pH** em água – Relação 1:2,5; **SB** – Somas de Bases Trocáveis; **CTC (t)** – Capacidade de Troca Catiônica Efetiva; **CTC (T)** – Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; **V** – Índice de saturação de base; **m** – Índice de Saturação de Alumínio; **M.O** – Matéria Orgânica; **P-Rem** – Fósforo Remanescente.

Fonte: Laboratório de Análise de Solos da UFLA.

Os solo-inóculos dos FMAs inoculados foram cedidos pela Coleção de Fungos micorrízicos arbusculares da Universidade Federal de Lavras - UFLA com os seguintes códigos de identificação: UFLA 314: *Scutellospora heterogama* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F.E. Sanders; UFLA 212: *Claroideoglo mus etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler e UFLA 01: *Acaulospora morrowiae* Spain & N.C. Schenck. Sendo que foram utilizados cerca de 150 esporos de cada espécie de FMAs por vaso (6 L). Nos tratamentos sem inoculação foram aplicados 10 mL de suspensão de inóculo filtrada em malha de 0,045mm para reter os esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).

Após 30 dias de aclimatização, foram selecionadas as mudas de erva-cidreira que apresentaram entre 3 a 4 pares de folhas. Posteriormente as plantas foram transplantadas em vasos de 6 L, onde foram aplicados os tratamentos, que consistiram de dois fatores. O primeiro fator (biótico) que foi a inoculação ou não de FMAs (*Scutellospora heterogama*, *Claroideoglo mus etunicatum*, *Acaulospora morrowiae*), em siglas respectivamente CF (com fungo) e SF (sem fungo). O segundo fator (abiótico) em relação à adubação orgânica a base de esterco bovino, com (CE) e sem (SE) a presença do mesmo, totalizando quatro tratamentos



(SFSE), (SFCE), (CFSE) e (CFCE). Sendo o tratamento SFSE o controle (sem adubação orgânica e sem fungos micorrízicos arbusculares).

Desta forma, o arranjo experimental foi organizado em Delineamento Inteiramente Casualizado - DIC em esquema fatorial 2 x 2 (com/sem fungos; com/sem esterco), contendo 5 repetições, com 6 plantas por repetição, totalizando 120 unidades experimentais, ou seja, 120 plantas. A irrigação foi realizada de forma manual de 2-3 vezes na semana, com auxílio de um becker de 500 mL.

## **2.3 Densidade de esporos, coloração de raízes e contagem da colonização**

### **2.3.1 Extração e contagem de esporos**

Após 90 dias do transplante, foram coletados 50g de solo de cada vaso com auxílio de um mini-trado e em seguida formada uma amostra composta por repetição. Como cada repetição foi formada por seis vasos, cada amostra composta resultou em 300g de solo, sendo que cada tratamento foi representado por cinco repetições.

A extração dos esporos foi realizada por meio da técnica de decantação e peneiramento por via úmida (GERDEMANN; NICOLSON, 1963), seguida de centrifugação em água e em sacarose 50% (JENKINS, 1964). Neste processo, 50g de solo foi totalmente destorroado e suspenso em água em um recipiente de aproximadamente 5 L, a água foi adicionada até a metade do recipiente, em seguida foram usadas duas peneiras sobrepostas de 0,071 mm (posição de cima) e 0,045 mm (posição de baixo) para peneirar a solução suspensa. O material retido na peneira de 0,045 mm foi colocado em tubos de centrifuga de 15 mL com auxílio de uma piseta e centrifugados por 3 minutos a 3.000 rpm.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado 10-12 mL de sacarose 50%, sendo homogeneizado com o resíduo decantado. Os tubos foram novamente colocados em centrifuga a 2.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi peneirado em peneira de 0,045 mm e lavado em água corrente para retirar o excesso de sacarose. Os esporos foram colocados em potes de 10 mL e armazenados em câmara fria a 5°C até o momento da contagem. A densidade foi determinada com uso de placa canelada sob microscópio estereoscópio e expressa em número de esporos por 50g de solo.

### 2.3.2 Coloração de raízes e contagem da colonização

A coloração das raízes foi realizada segundo o método de Phillips e Hayman (1970), modificado por Koske e Gemma (1989). Foram coletadas 2g de raízes por planta, sendo formada uma amostra composta de 4g a cada dois vasos, ou seja, 3 amostras por repetição, totalizando 60 amostras, 15 por tratamento. As raízes finas, cerca de 1g, foram lavadas em água corrente e colocadas em cápsulas plásticas. Logo após, as mesmas foram imersas em solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% e deixadas em banho-maria por 60 minutos para descoloração.

Ao término desse processo, o excesso de KOH foi retirado em água corrente e em seguida as raízes permaneceram por 10 minutos em solução de ácido clorídrico (HCl) a 1% para ajudar a fixar o corante. Posteriormente, as raízes permaneceram imersas por 24h em solução contendo o corante azul de tripano a 0,05% e depois foram colocadas em frascos de vidros contendo glicerol acidificado (500 mL de glicerina + 450 mL de água destilada + 50 mL de ácido clorídrico 1%) para preservar as características anatômicas até o momento da análise. Uma vez coloridas, a percentagem de colonização micorrízica e a densidade de ocupação fúngica na raiz foi determinada em microscópico óptico segundo Trouvelot et al. (1986) com modificações adaptadas de Mc Gonigle et al (1990) e Herrera-Perraza et al (2004).

Após essa etapa, foram montadas lâminas contendo entre 10-12 fragmentos de raízes de cada uma das 60 amostras de raízes para se obter 100 campos visuais de leitura no microscópico óptico. Sendo que cada amostra foi analisada em triplicata, ou seja, foram feitas três lâminas para cada uma delas. A visualização da densidade de ocupação fúngica na raiz e percentagem de colonização foi realizada com base em uma escala contendo 6 níveis: 0 (0%); 1 (1-20%); 2 (21-40%); 3 (41-60%); 4 (61-80%) e 5 (> 80%) de colonização (HERRERA-PERRAZA et al., 2004).

A eficiência da simbiose (ES), em termos de crescimento da parte aérea, foi calculada da seguinte forma:  $ES (\%) = [(matéria\ seca\ de\ plantas\ micorrizadas. - matéria\ seca\ de\ plantas\ não\ micorrizadas) / matéria\ seca\ de\ plantas\ micorrizadas] \times 100$  (STANCATO; SILVEIRA, 2006).

## 2.4 Análise do crescimento

As variáveis de comprimento da parte aérea e diâmetro da planta foram avaliados a cada 15 dias com auxílio de um paquímetro e de uma fita métrica. Já os parâmetros de matéria seca das folhas (MSF), matéria seca dos caules (MSC), matéria seca das raízes (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca total (MST= MSF+MSC+MSR), razão raiz/parte aérea (R/PA) foram avaliados após 90 dias do transplântio.

Cada planta colhida foi dividida em raiz, caule e folha. Após isto, foram colocadas em papel Kraft e acondicionadas em estufa de circulação de ar forçada para secarem a 39°C, enquanto que as raízes foram lavadas e depois retiradas à umidade excessiva, para também serem conduzidas à estufa. Em seguida o material foi pesado em balança digital. Depois de atingido peso constante, foram obtidas as suas massas em gramas (g).

### 2.4.1 Área foliar e análise nutricional

A área foliar total (AFT) foi mensurada utilizando um Medidor Eletrônico de Área Foliar Modelo LI - 3100 – LICOR. Escolheram-se três plantas representativas de cada tratamento, e destas avaliaram-se a área foliar de todas as folhas. Em seguida, foram considerado os seguintes parâmetros como a área foliar total (AFT), razão de área foliar (RAF = AFT/MStotal), área foliar específica (AFE = AFT/MSfolhas) e a razão peso foliar (RPF = MSfolha/MStotal) (BENINCASA, 2003).

A análise de teor de macronutrientes e micronutrientes nas folhas de *M. officinalis* L. foi realizada conforme a metodologia de Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

## 2.5 Análise de pigmentos fotossintéticos

O conteúdo de fotossintatos foi extraído e analisado de acordo com o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979). O material vegetal foi coletado pelo período da manhã na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras. As folhas coletadas entre o terceiro e quarto nó caulinar foram transportadas em um recipiente fechado para evitar a incidência de luz e conseqüentemente a degradação da clorofila. Folhas frescas de *Melissa officinalis* L. (50 mg) foram pesadas diretamente em tubos

de Falcon cobertos com papel alumínio e incubadas com 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e, mantidos em estufa a 65 °C por 24 h. As amostras foram preparadas em triplicatas.

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 em branco. O valor de densidade óptica específica de cada amostra foi calculada 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:

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

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

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

A clorofila total (a + b) foi calculada pelo somatório dos resultados encontrados das equações para clorofila a e b, sendo todos os resultados expressos em mg g<sup>-1</sup> matéria fresca.

## 2.6 Extração do óleo essencial de *Melissa officinalis* L.

Os óleos essenciais de *M. officinalis* foram extraído por hidrodestilação em aparelho modificado de Clevenger, a partir de 40g de folhas secas em balão volumétrico de 2000 mL, contendo 1000 mL de água destilada. O tempo de extração foi de 90 minutos, considerado a partir do início da fervura.

Posteriormente realizou-se partição líquido-líquido, em funil de separação, do hidrolato com três porções de 25mL de diclorometano, para a purificação do óleo essencial as frações orgânicas foram reunidas e tratadas com sulfato de magnésio anidro, seguida de filtração simples e evaporação do solvente orgânico sob capela de exaustão de gases.

O óleo essencial foi pesado e armazenado em frasco âmbar hermeticamente fechado e mantido em geladeira a 4 °C até as análises. O teor de óleo essencial foi expresso em g.100-g<sup>-1</sup> de matéria seca das folhas e o rendimento em g.planta<sup>-1</sup>.

## 2.7 Análises químicas do óleo essencial

As análises químicas quantitativas dos óleos voláteis foram realizadas em triplicatas, empregando sistema de Cromatografia em Fase Gasosa (CG) Agilent® 7890A, operado

com sistema de processamento de dados MSD CHEM Station Ver. E.02.02.1431, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) e um Detector de Ionização em Chama (DIC). Carvacrol foi usado como padrão interno. As amostras foram preparadas acrescentando-se 10 µL de solução estoque do padrão interno às massas conhecidas do óleo essencial e diluindo-se com 1 mL de acetato de etila. O volume de injeção foi de 1,0 µL, no modo split a uma razão de injeção de 50:1. Empregou-se coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C e 300°C, respectivamente. A condição de análise foi de rampa de aquecimento de 60 a 240°C, com taxa de aquecimento de 3°C/min, seguida por outra rampa de 10 °C/min até 280°C. As análises foram realizadas em triplicata (n=3) e as concentrações dos analitos foram expressas em mg/mL ± o desvio padrão. As concentrações dos analitos foram determinadas empregando-se o método do padrão interno, usando fator de resposta relativo de acordo com IOFI Working Group on Methods of Analysis (IOFI, 2011).

As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® 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-DIC.

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20) e/ou por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2017). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção descritos em literatura (ADAMS, 2017).

## **2.8 Análises estatísticas**

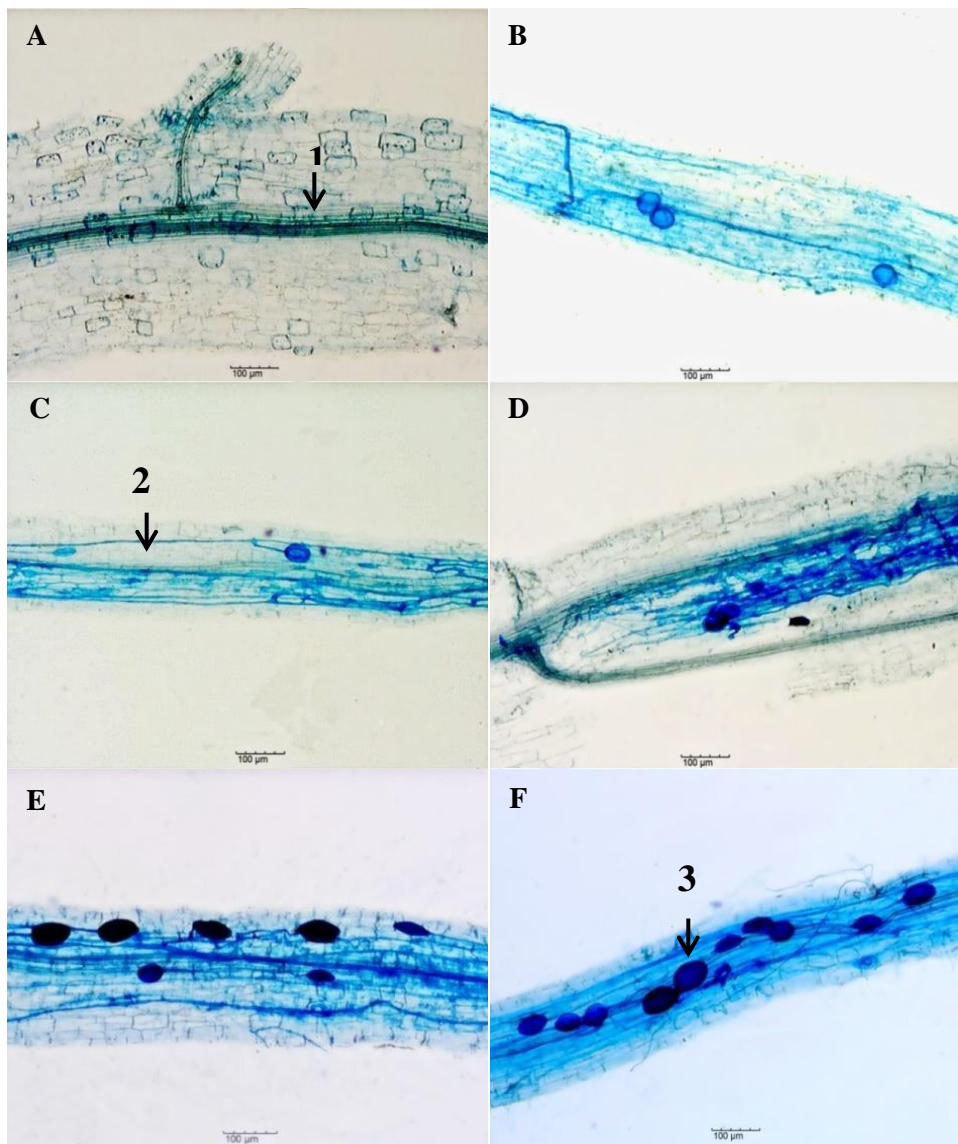
Os dados coletados foram submetidos aos testes de normalidade e submetidos à análise de variância pelo teste F. As médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sistema para Análise de Variância SISVAR (FERREIRA, 2014).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Densidade de esporos e Colonização micorrízica

Na Figura 3.1 estão representadas as notas da escala 0 (0%); 1 (1-20%); 2 (21-40%); 3 (41-60%); 4 (61-80%) e 5 (>80%) atribuídas à colonização de FMAs em raízes de *Melissa officinalis* L., cada uma conforme a porcentagem de ocupação nas raízes.

Figura 3.1 — Representação das notas atribuídas durante as avaliações da colonização de FMAs em raízes da espécie *M. officinalis* L. cultivada em casa de vegetação.



Densidade de colonização conforme as notas atribuídas na escala: **A = 0%**; **B = 1-20%**; **C = 21-40%**; **D = 41-60%**; **E = 61-80%** e **F = > 80%**. **1** (Vasos condutores); **2** (Hifas); **3** (Vesículas).

Fonte: Do autor, 2019.

Na Tabela 3.2, estão representados os dados de colonização de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) com os seguintes parâmetros, densidade de esporos, porcentagem de infecção e densidade visual. Constata-se que a espécie *Melissa officinalis* L. estabeleceu relações simbióticas com os FMAs.

Em nenhuma das variáveis ocorreu interação significativa entre os fatores de inoculação e de adubação orgânica ( $p \leq 0,05$ ) APÊNDICE A. Para densidade de esporo de FMAs houve diferença significativa somente entre os tratamentos inoculados. O tratamento CFSE obteve maior média (105,7 esporos), o que pode ter ocorrido devido às condições menos favoráveis à planta, que, por sua vez favorecem a esporulação do fungo. Já o CFCE apresentou média de 33,6 esporos.

Tabela 3.2 — Variáveis de colonização de FMAs na espécie *M. officinalis* L. cultivada com e sem adubação orgânica em casa de vegetação.

| Tratamentos | Densidade de Esporo |         | Colonização micorrízica % |        |
|-------------|---------------------|---------|---------------------------|--------|
|             | SF                  | CF      | SF                        | CF     |
| SE          | 84,6aA              | 105,7aA | 23,1aB                    | 46,2aA |
| CE          | 35aA                | 33,6bA  | 29,6aB                    | 43,6aA |
| CV%         | 57,6                |         | 26,4                      |        |

**SE:** Sem esterco; **CE:** Com esterco; **SF:** Sem fungo; **CF:** Com fungo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor, 2019.

Em relação a porcentagem de colonização, a diferença significativa aconteceu apenas em relação ao fator fungo, pois é notável que os tratamentos inoculados com FMAs (CFSE e CFCE) demonstraram taxas de colonização significativamente superior (46,2 e 43,6%, respectivamente), quando comparados com os sem inoculação (SFSE e SFCE) com valores de 23,1 e 29,6%, respectivamente. Outro ponto observado está na relação entre a densidade de esporos com a porcentagem de infecção, pois, apesar dos tratamentos sem fungos apresentarem esporos, a infecção dos mesmos foi significativamente menor.

Também é notável que os tratamentos sem inoculação (SF) foram contaminados pelos FMAs. As possíveis fontes de contaminação podem ter sido a irrigação, já que a água utilizada não passou por nenhum processo de esterilização, ou até mesmo o substrato inicial (advindo da fase de enraizamento e aclimatização) e a ventilação da casa de vegetação. No entanto, para efeito de resultado a quantidade inoculada de aproximadamente 450 esporos por vaso supera possíveis contaminações.

Por meio dos dados obtidos, pode-se confirmar que a erva-cidreira apresentou compatibilidade para colonização com FMAs. Conforme Harrison (1999), para uma completa interação entre planta-fungo e para um bom desenvolvimento da simbiose é necessário uma interação genética e funcional entre os mesmos.

Os autores Moreira e Siqueira (2006) afirmam que os fenóis presentes em algumas plantas são capazes de estimular o crescimento de FMAs e a colonização de raízes. Tal fato pode ter contribuído para a colonização, já que a espécie apresenta elevados níveis de constituintes fenólicos (MÜZELL, 2006). Além disso, Engel et al. (2016) estudando a mesma espécie observaram colonização de FMAs (*Claroideoglomerus etunicatum*, *Claroideoglomerus claroideum* e *Rhizophagus intraradices*) com uma intensidade de 62,5%. Russomanno, Kruppa e Minihoni (2008) confirmaram a presença de FMAs em duas espécies da família Lamiaceae, *Rosmarinus officinalis* L. e *Ocimum basilicum* L. Nesse presente estudo, comprovou-se que os fungos micorrízicos colonizaram as raízes da erva-cidreira.

Também observa-se que a colonização ocorreu tanto na ausência como na presença da adubação orgânica. Nos tratamentos CFSE e CFCE, as porcentagens de infecção foram, respectivamente, 46,2 e 43,6% não diferindo estatisticamente. Porém a maior porcentagem de colonização no tratamento CFSE pode estar relacionado com as características químicas do solo, principalmente, em relação ao fósforo (P), que está diretamente ligado ao processo de colonização, onde o solo sem e com esterco apresentaram os respectivos valores para este elemento, 8,7 e 17,2 cmolc/dm<sup>3</sup>.

O autor Bressan et al. (2001) confirmou que em baixas doses de fósforos a eficiência da colonização pode aumentar, e em altas doses a tendência é diminuir. Pereira et al. (2018), também obtiveram colonização ao utilizar adubação orgânica a base de esterco bovino no cultivo de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae).

### 3.2 Análises de crescimento

As médias do comprimento da parte aérea (CM) e do diâmetro (DM) estão apresentadas na Tabela 3.3. Houve interação significativa somente para o comprimento da planta. Conforme os dados abaixo verificou-se que o tratamento CFSE (19,0 cm) foi significativamente maior do que o tratamento SFSE (16,6 cm). Além disso, os tratamentos inoculados com FMAs (CFSE e CFCE) não diferiram entre si, mas quando comparados com os tratamentos sem inoculação (SFSE e SFCE), os mesmos apresentaram diferenças



significativas entre si, com comprimentos de 16,6 e 19,4 cm, respectivamente. Camprubi et al. (2015) observaram efeitos positivos ao estudar a influência dos FMAs (*Rhizophagus irregularis* syn. *Glomus intraradices*, *Funneliformis mosseae* syn. *Glomus mosseae*), no cultivo da espécie *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), pois a simbiose proporcionou crescimento acelerado para esta espécie. Tarraf et al. (2017) afirmam que a simbiose micorrízica promoveu o crescimento e melhorou a absorção de nutrientes em solos de baixa fertilidade, cultivando *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae). Esses estudos confirmam o importante papel dos fungos micorrízicos em proporcionar ao vegetal maior adaptabilidade em situações de estresse, neste caso, nutricional.

Tabela 3.3 — Médias do comprimento da parte aérea (CPA) e diâmetro do caule (DC) da espécie *M. officinalis* L. cultivada sob influência de FMAs e da adubação orgânica em casa de vegetação.

| Tratamentos | CPA (cm) |         | DC (cm) |        |
|-------------|----------|---------|---------|--------|
|             | SF       | CF      | SF      | CF     |
| SE          | 16,62bB  | 19,0aA  | 2,23bA  | 2,25bA |
| CE          | 19,45aA  | 19,21aA | 2,88aA  | 2,77aA |
| CV%         | 5,8      |         | 3,6     |        |

**SE:** Sem esterco; **CE:** Com esterco; **SF:** Sem fungos; **CF:** Com fungos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

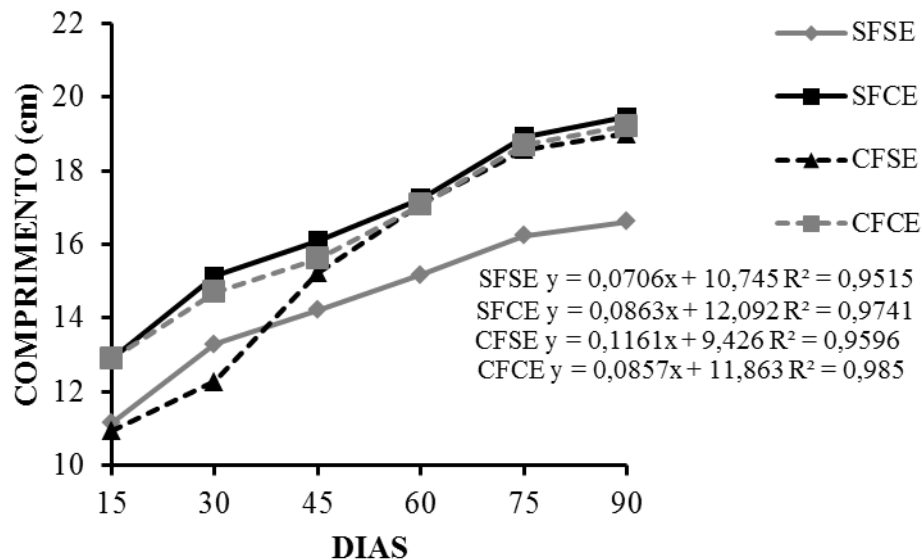
Fonte: Do autor, 2019.

Para o diâmetro, não ocorreu diferença entre o fator fungo, somente no fator esterco, sendo que os tratamentos SFCE e CFCE, apresentaram as maiores médias 2,88 e 2,77, respectivamente, em relação aos sem esterco SFSE e CFSE, com médias de aproximadamente de 2,2 cm para ambos.

Na Figura 3.2 está demonstrado o comprimento médio da planta, de cada tratamento em um período de 90 dias, com intervalo de 15 dias para cada avaliação. No que se refere ao tratamento CFSE, é notável o ganho em comprimento no intervalo de 30 dias (12,3 cm) e 45 dias (15,2 cm), quando comparado com os demais. Esse resultado pode está associado ao estabelecimento da simbiose entre fungo-planta. De acordo com a literatura pesquisada, não existe um consenso no que diz respeito ao tempo necessário para estabilização da colonização de fungos micorrízicos, pois esse fator varia conforme o hospedeiro e as condições ambientais do cultivo. Porém, Rasmussen et al. (2016) e Jiang et al. (2017), verificaram em estudos que a

colonização por fungos micorrízicos ocorreu em um período de tempo de 28 e 42 dias, respectivamente.

Figura 3.2 — Comprimento da parte aérea da espécie *M. officinalis* L. a cada 15 dias durante 90 dias de avaliação sob influência dos FMAs e da adubação orgânica cultivada em casa de vegetação.



SE: Sem esterco; CE: Com esterco; SF: Sem fungo; CF: Com fungo.

Fonte: Do autor, 2019.

As médias das variáveis de matéria seca das folhas (MSF), caule (MSC), raiz (MSR), parte aérea (MSPA), total (MST) e razão raiz/parte aérea estão demonstrados na Tabela 3.4. Ocorreu interação significativa para todos os parâmetros avaliados.

Todos os parâmetros de matéria seca foram superiores nos tratamentos contendo esterco (SFCE e CFCE) quando comparados com os que não foram adubados (SFSE e CFSE), exceto na matéria seca do caule (MSC), onde o tratamento CFSE apresentou maior média em relação ao CFCE (1,69 e 1,45 g, respectivamente). Sodré et al. (2013) estudando a mesma espécie, também obteve maiores massa de matéria seca, quando utilizou adubação orgânica (esterco bovino).

A presença da adubação orgânica melhorou consideravelmente as características químicas do solo (TABELA 3.1) em relação ao sem adubo. Tal fato, influenciou significativamente a matéria seca da espécie *M. officinalis* L. De Araújo et al. (2008) obtiveram melhoras nas características de P, K, Ca, M.O e pH ao utilizar como fonte de matéria orgânica o esterco bovino curtido.

Tabela 3.4 — Média da matéria seca da folha (MSF), caule (MSC), raiz (MSR), parte aérea (MSPA), total (MST) e razão raiz / parte aérea (R/PA) da espécie *M. officinalis* L. sob influência de FMAs e adubação orgânica cultivada em casa de vegetação.

| Trat. | MSF    |        | MSC    |        | MSR    |        | MSPA   |        | MST     |        | R/PA   |        |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
|       | SF     | CF     | SF     | CF     | SF     | CF     | SF     | CF     | SF      | CF     | SF     | CF     |
| SE    | 1,54bB | 2,99bA | 0,97bB | 1,69aA | 1,28bB | 1,53bA | 2,50bB | 4,68bA | 3,78bB  | 7,21bA | 0,51bA | 0,54bA |
| CE    | 4,09aA | 3,87aA | 1,61aA | 1,45bA | 5,16aA | 4,12aB | 5,70aA | 5,32aA | 10,87aA | 9,44aB | 0,91aA | 0,78aB |
| CV%   | 10,7   |        | 10,9   |        | 6,7    |        | 10,3   |        | 7,3     |        | 10,0   |        |

**SE:** Sem esterco; **CE:** Com esterco; **SF:** Sem fungos; **CF:** Com fungos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor, 2019.

Fazendo uma analogia entre os tratamentos SFSE e CFSE, observa-se que, para todas as variáveis apresentadas na Tabela 3.4, a presença dos fungos micorrízicos arbusculares foi importante para o ganho de matéria seca. O ganho em matéria seca, das plantas cultivadas nos vasos CFSE em relação à SFSE, na folha foi de 94%; caule 74%; parte aérea 87%; raiz 19% e total de 91%. Isso pode estar relacionado com o importante papel dos FMAs no ciclo do carbono (C) no solo, devido à sua direta influência sobre a produtividade primária, graças a sua função na absorção de água e nutrientes por plantas (ZHU e MILLER, 2003). De acordo com Jakobsen, Smith e Smith (2002), os FMAs são drenos importantes de C da planta, podendo translocar até 20% do C fixado pela planta para o fungo. Como resposta da planta, há aumentos significativos de sua taxa fotossintética, ocasionando aumento no potencial da produtividade primária.

Observou-se também que os tratamentos sem adubação orgânica apresentaram crescimento da parte aérea inferior às plantas de melissa adubadas com fertilizante orgânico, mostrando que essa espécie responde positivamente a este fator de produção (FIGURA 3.3).

Comparando a eficiência da simbiose em termos de crescimento da parte aérea entre o controle (SFSE) e o tratamento CFSE, observou-se que o estabelecimento da simbiose proporcionou um incremento de 46,6% de matéria seca. Soares et al. (2012) corroboram com estes resultados, pois verificou que os FMAs (*Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Glomus manihots*, *Gigaspora albida*, *Acaulospora scrobiculata* e *Scutellospora heterogama*) promoveram acréscimos de matéria seca da parte aérea na espécie *Genipa americana* L.

A razão raiz/parte aérea indica a alocação preferencial de massa seca para o sistema radicular. As maiores médias significativas dessa relação foram observadas nos tratamentos SFCE (0,91 g) e CFCE (0,78), evidenciando mais uma vez a importância da adubação

orgânica a base de esterco bovino para erva-cidreira. Brant (2008) também obteve maiores médias de R/PA nos tratamentos com adubação bovina quando comparado com o controle.

Figura 3.3 — Plantas de *M. officinalis* L. cultivadas em casa de vegetação sob a influência dos fungos micorrízicos arbusculares e da adubação orgânica.



**SFSE:** Sem fungo/sem esterco; **CFSE:** Com fungo/sem esterco; **SFCE:** Sem fungo/com esterco; **CFCE:** Com fungo/com esterco.

Fonte: Do autor, 2019.

No que diz respeito às variáveis de área foliar, não foram observadas nenhuma interação significativa (TABELA 3.5). Só houve diferenças no fator esterco, sendo que para todos os parâmetros, os tratamentos com adubação orgânica (SFCE e CFCE) apresentaram médias significativamente maiores ao correlacionar com os tratamentos sem adubação (SFSE e CFSE).

Os maiores valores de área foliar total (AFT) foram encontrados nos tratamentos SFCE e CFCE, com 11,5 e 11,1 cm<sup>2</sup>, respectivamente (TABELA 3.5). Quando se relaciona esses dados com os de matéria seca (TABELA 3.4), pode-se inferir que essa maior área foliar contribuiu para um maior acúmulo de MSF, MSR, MSPA e MST, em relação aos tratamentos sem adubação orgânica. Segundo Magalhães et al. (2007), a área foliar está inteiramente

relacionada à produção final de massa seca, pois durante o ciclo de desenvolvimento, a planta depende das folhas como órgãos fotossintetizantes e a taxa de crescimento da planta depende tanto da taxa de expansão da área foliar como da taxa de fotossíntese por unidade de área foliar.

Tabela 3.5 — Análise de área foliar da espécie *M. officinalis* L. cultivada sob a influência de FMAs e adubação orgânica em casa de vegetação.

| Tratamentos | AFT (cm <sup>2</sup> ) |         | RAF (cm <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> ) |        | AFE (cm <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> ) |        | RPF (g.g <sup>-1</sup> ) |        |
|-------------|------------------------|---------|---|--------|---|--------|--------------------------|--------|
|             | SF                     | CF      | SF                                      | CF     | SF                                      | CF     | SF                       | CF     |
| SE          | 3,45bA                 | 6,17aA  | 1,14bA                                  | 1,14bA | 1,91bA                                  | 1,84aA | 0,61bA                   | 0,62bA |
| CE          | 11,51aA                | 11,10aA | 2,17aA                                  | 1,97aA | 2,98aA                                  | 2,66aA | 0,73aA                   | 0,74aA |
| CV%         | 32,6                   |         | 19,0                                    |        | 18,5                                    |        | 6,0                      |        |

**MF:** Matéria fresca; **SE:** Sem esterco; **CE:** Com esterco; **SF:** Sem fungos; **CF:** Com fungos. **AFT:** Área foliar total; **RAF:** Razão de área foliar; **AFE:** Área foliar específica; **RPF:** Razão de massa foliar. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor, 2019.

A RAF que expressa área foliar disponível para que ocorra a fotossíntese, apresentou maiores médias significativas (2,17 e 1,97 cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) nos respectivos tratamentos, SFCE e CFCE, em relação aos tratamento sem esterco (SFSE e CFSE), que obtiveram as menores médias, ambos com 1,14 cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>. Outra variável que comprova esse resultado foi apresentada na Tabela 3.4, na qual os tratamentos com elevada RAF apresentaram maiores médias significativas de matéria seca, quando comparados com os sem esterco. Costa et al. (2013), estudando o efeito de doses de esterco bovino na espécie *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) também observou maiores médias de RAF em relação ao controle (sem esterco).

A área foliar específica (AFE), variável que relaciona a superfície da folha com o peso da própria, apresentou menores médias nos tratamentos sem adubação orgânica (SFSE e CFSE), 1,91 e 1,84 cm<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, respectivamente, em relação aos com esterco. De acordo com Iozzi et al. (2000), menores valores desse parâmetro podem significar maiores acúmulos de matéria seca, resultando em folhas mais espessas. Neste caso, os dados do presente estudo não corroboram com o autor, pois os tratamentos com menor AFE apresentaram as menores médias de matéria seca.

A razão de peso das folhas (RPF) expressa a fração de massa seca não exportada das folhas para o resto da planta. Desta forma, observar-se que os tratamentos SFCE e CFCE apresentaram as maiores médias significativas, com 0,73 e 0,74 g.g<sup>-1</sup>, respectivamente,

coincidindo com as maiores médias de matéria seca de folhas (MSF), 4,09 e 3,87 respectivamente (TABELA 3.4). Essa correlação corrobora com o trabalho de Costa et al. (2013) que obteve maiores médias de RPF e MSF em relação ao controle quando a espécie *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) foi adubada com esterco bovino. Ou seja, isso infere que o uso desse adubo orgânico permitiu uma fração maior de material para ser retido nas folhas enquanto diminui o transporte desse material para outras partes da planta.

Os menores índices de área foliar observados nos tratamentos SFSE e CFSE pode está relacionado com a adaptação ao estresse. Segundo Taiz et al. (2017), as folhas grandes e planas proporcionam superfícies ótimas para a produção de fotossintatos. Porém, elas podem ser prejudiciais ao crescimento e à sobrevivência de culturas agrícolas sob condições estressantes, pois expõem uma ampla área de superfície para a evaporação de água, que pode levar ao rápido esgotamento da água do solo.

### **3.3 Análises de pigmentos fotossintéticos**

Na Tabela 3.6 estão apresentadas as médias de clorofilas *a*, *b* e total, bem como as médias de carotenoides. Em relação aos pigmentos fotossintéticos, ocorreu interação significativa somente para a variável de clorofila *b*, e para todos os demais parâmetros os tratamentos sem esterco (SFSE e CFSE) apresentaram as maiores médias quando comparados com os adubados (SFCE e CFCE).

As maiores médias de pigmentos fotossintéticos dos tratamentos SFSE e CFSE podem ser devido as menores médias de AFE (TABELA 3.5), pois Bettoni et al. (2013), assegura que essa redução de AFE está ligada ao espessamento das folhas pelo acúmulo de fotossintatos.

Tabela 3.6 — Médias de clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides da espécie *M. officinalis* L. cultivada sob a influência de FMAs e adubação orgânica em casa de vegetação.

| Tratamentos | Pigmentos fotossintéticos          |        |                    |        |                 |        |              |        |
|-------------|------------------------------------|--------|--------------------|--------|-----------------|--------|--------------|--------|
|             | Clorofila <i>a</i>                 |        | Clorofila <i>b</i> |        | Clorofila total |        | Carotenóides |        |
|             | .....(mg.g <sup>-1</sup> MF) ..... |        |                    |        |                 |        |              |        |
|             | SF                                 | CF     | SF                 | CF     | SF              | CF     | SF           | CF     |
| SE          | 0,49aA                             | 0,51aA | 0,29aA             | 0,31aA | 0,77aA          | 0,81aA | 0,18aA       | 0,17aA |
| CE          | 0,27bA                             | 0,31bA | 0,27aA             | 0,17bB | 0,55bA          | 0,48bA | 0,11bA       | 0,11bA |
| CV%         | 8,4                                |        | 9,6                |        | 8,7             |        | 9,3          |        |

**MF:** Matéria fresca; **SE:** Sem esterco; **CE:** Com esterco; **SF:** Sem fungos; **CF:** Com fungos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas entre nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor, 2019.

Porém esses dados não corroboram com os encontrados na literatura, pois na maioria das pesquisas demonstram que as plantas adubadas com esterco bovino tendem a ter maiores teores de pigmentos fotossintéticos. Corrêa et al. (2009) estudando a influência da adubação bovina na espécie *Origanum vulgare* L (Lamiaceae), observou maiores quantidades de clorofila *a*, *b* e total em plantas adubadas, quando comparadas com o controle (sem adubação). Conforme o mesmo autor, os valores elevados desses pigmentos no *O. vulgare* podem ser explicados pela maior disponibilidade de nutrientes promovida pela adubação, principalmente, em relação ao nitrogênio e ao magnésio, pois fazem parte da molécula de clorofila.

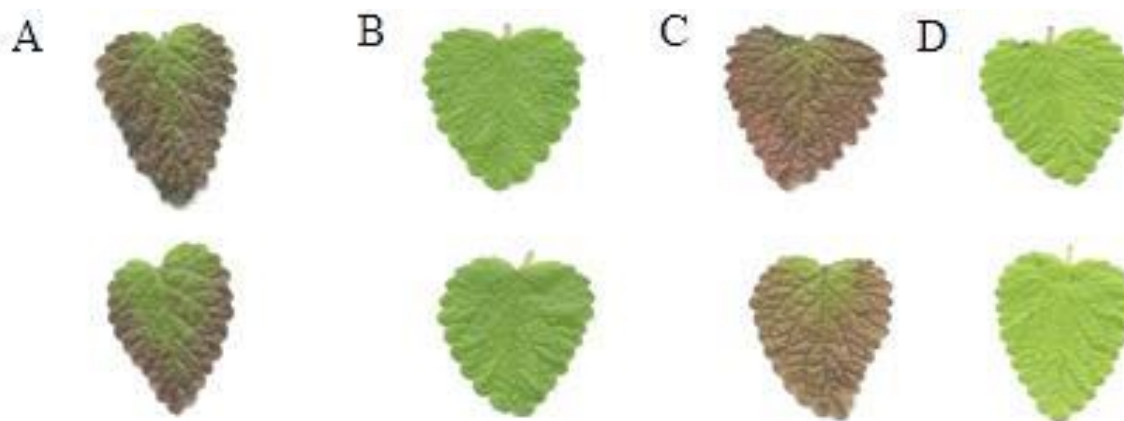
De acordo com Silva et al. (2018), o cultivo de *Melissa officinalis* L. obteve valores superiores para a clorofila *a* (0,38 mg.g<sup>-1</sup>MF), clorofila *b* (0,57 mg.g<sup>-1</sup>MF), clorofila total (0,95 mg.g<sup>-1</sup>MF) e carotenoides (0,43 mg.g<sup>-1</sup>MF) na presença do esterco bovino, quando comparado com a presente pesquisa. Brito, Momenté e Nascimento (2012), não observaram diferenças significativas com o incremento de doses de esterco bovino nos pigmentos fotossintéticos da espécie *Mentha spicata* L. (Lamiaceae), devido a baixa taxa de mineralização do esterco bovino durante o cultivo, ou seja, houve um pequeno incremento de nutrientes, principalmente nitrogênio na solução do solo.

O aumento dos pigmentos fotossintéticos dos tratamentos SFSE e CFSE pode ter ocorrido para compensar os menores índices de área foliar apresentados na Tabela 3.5, de modo a manter as atividades fisiológicas e conseqüentemente a sobrevivência da espécie.

Na Figura 3.4 estão demonstradas as diferenças de pigmentação foliar entre os tratamentos. O elevado conteúdo de carotenóides nos tratamentos SFSE e CFSE pode estar relacionado com a ausência de adubação orgânica, que pode ter desencadeado um estresse nas

plantas (FIGURA 3.2 A e C). Segundo Taiz et al. (2017), os metabólitos secundários desempenham um papel importante na resposta de defesa da planta e agem como moduladores da resposta ao estresse abiótico.

Figura 3.4 — Folhas de *Melissa officinalis* L. com diferentes pigmentações.



**A** (Sem fungos/Sem esterco); **B** (Sem fungo/Com esterco); **C** (Com fungo/Sem esterco); **D** (Com fungo/Com esterco).

Fonte: Do autor, 2019.

Angelo e Jorge (2007), afirmam que os constituintes fenólicos (dentre eles carotenóides), em plantas, são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação. Fato este, representado na Figura 3.2, pois observa-se que os tratamentos sem esterco (SFSE e CFSE) apresentaram mais pigmentação quando comparados com os adubados (SFCE e CFCE) e conseqüentemente maior teor de carotenoides.

### 3.4 Análise foliar

Na Tabela 3.7 estão demonstrados os valores nutricionais da análise foliar da espécie *M. officinalis* L. cultivada sob a influência dos FMAs e da adubação orgânica. Em relação ao nitrogênio (N), verificar-se que o maior acúmulo ocorreu no tratamento controle (SFSE), não corroborando com os resultados encontrados na literatura, pois geralmente as plantas na presença da adubação orgânica tendem a ter maior acúmulo de nutrientes nas folhas. Sales et al. (2009) estudando o cultivo de *Hyptis marruboides* EPL. (Lamiaceae) com diferentes doses de esterco bovino observou maior teor de N foliar conforme o aumento das doses, em relação ao sem adubação. Os mesmos autores enfatizam que as propriedades químicas do solo



modificadas pela adição dos adubos orgânicos, exercem grande influência na produção de plantas medicinais.

Tabela 3.7 — Teor de macro (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Zn) nas folhas de *M. officinalis* L. cultivada sob influência de FMAs e da adubação orgânica em casa de vegetação.

| Tratamentos | N                             | P    | K     | Ca    | Mg   | S    | B                              | Cu    | Fe      | Mn     | Zn    |
|-------------|-------------------------------|------|-------|-------|------|------|--------------------------------|-------|---------|--------|-------|
|             | .....g.kg <sup>-1</sup> ..... |      |       |       |      |      | .....mg.kg <sup>-1</sup> ..... |       |         |        |       |
| SFSE        | 22,57                         | 1,25 | 31,66 | 12,63 | 4,07 | 3,74 | 31,63                          | 20,81 | 540,09  | 174,37 | 33,88 |
| SFCE        | 20,80                         | 2,81 | 39,89 | 16,44 | 5,85 | 5,92 | 52,74                          | 10,84 | 342,23  | 161,37 | 43,27 |
| CFSE        | 12,27                         | 1,11 | 30,03 | 10,44 | 3,85 | 3,31 | 26,92                          | 9,73  | 1044,38 | 145,09 | 23,99 |
| CFCE        | 15,60                         | 3,98 | 38,78 | 15,63 | 6,23 | 8,81 | 49,61                          | 10,85 | 312,78  | 160,82 | 44,65 |

**MF:** **SFSE:** Sem fungos/Sem esterco; **SFCE:** Sem fungos/Com esterco; **CFSE:** Com fungos/Sem esterco; **CFCE:** Com fungos/Com esterco.

Fonte: Do autor, 2019.

Foi calculado o efeito de diluição (MSPA x teor de nutriente nas folhas) para o nitrogênio, já que está diretamente relacionado com crescimento e desenvolvimento da planta e conforme Taiz et al, (2017) este macronutriente está presente em muitos componentes celulares vegetais, incluindo clorofila, aminoácidos ácidos nucleicos. A partir disso, observou-se que os tratamentos com adubação orgânica (SFCE e CFCE) apresentaram os maiores valores de nitrogênio acumulados nas folhas com 118,56 e 82,9 g.kg<sup>-1</sup>, respectivamente, quando comparados com os sem (SFSE e CFSE), que obtiveram respectivamente os valores de 56,4 e 57,4 g.kg<sup>-1</sup>.

Outro fator observado foi em relação aos tratamentos CFSE e CFCE, que apresentaram maior porcentagem de colonização de FMAs (TABELA 3.2), porém menores quantidades de N nas folhas 12,27 g.Kg<sup>-1</sup> e 15, 60 g.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente quando comparado com os demais SFSE (22,57 g.Kg<sup>-1</sup>) e SFCE (20,80 g.Kg<sup>-1</sup>). Resultados estes que se assemelham com os de Arango et al. (2012), pois ao estudar a inoculação de fungos micorrízicos (*Funneliformis mosseae* (syn. *Glomus mosseae*) e *Rhizophagus irregularis*) na espécie *Mentha piperita* L. (Lamiaceae), constatou que o teor de N não foi alterado pelos fungos.

Porém, outras pesquisas evidenciaram o contrário, ou seja, os fungos micorrízicos (*Funneliformis mosseae*, *G. clarum*, *G. etunicatum*, *Gigaspora margarita* e *Acaulospora scrobiculata*) proporcionaram aumento da quantidade de N na parte aérea (CHEN et al., 2010;

FREITAS, MARTINS e CARVALHO, 2006), sendo estes efeitos mais encontrados e esperados, já que a simbiose dos FMAs pode melhorar a absorção de nutrientes, melhorando a exploração do solo e contribuindo para aumentar o crescimento e o vigor das plantas (BELTRANO e RONCO, 2008). Outra explicação para este acontecimento pode ser devido o N possuir grande mobilidade no solo, desta forma a planta não necessita dos FMAs para absorção nitrogenada, já que seu próprio sistema radicular é capaz de absorvê-lo (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006).

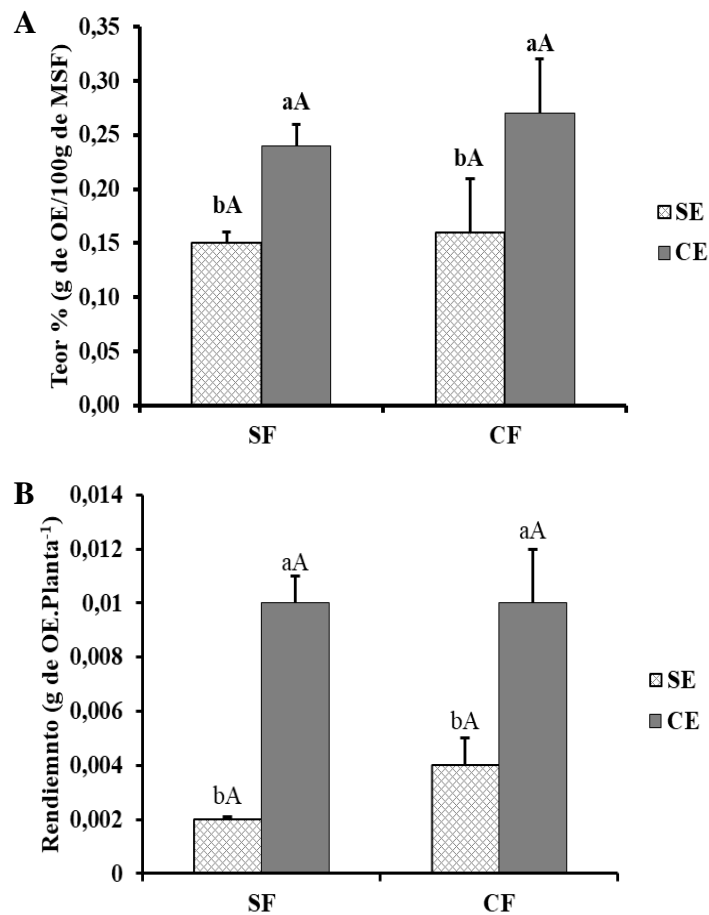
De acordo com Berbara, Souza e Fonseca (2006), as micorrizas arbusculares são reconhecidas por sua habilidade em estimular o crescimento de plantas, principalmente por meio do incremento na absorção de nutrientes em geral, fósforo (P) em especial. Conforme os dados de análise nutricional foliar presente na Tabela 3.7, nota-se que o tratamento com inoculação de FMAs e com adubação orgânica (CFCE) obteve o maior valor de P ( $3,98 \text{ g.Kg}^{-1}$ ) em relação aos demais, SFSE ( $1,25 \text{ g.Kg}^{-1}$ ), SFCE ( $2,81 \text{ g.Kg}^{-1}$ ) e CFSE ( $1,11 \text{ g.Kg}^{-1}$ ). De Sousa e Lobato (2004) afirmam que uma das maneiras de aumentar a reciclagem e a eficiência do uso do P pelas plantas é o aumento das quantidades de matéria orgânica (M.O) no solo, fato este, já mencionado anteriormente (TABELA 3.1), pois ao adicionar a adubação orgânica no solo o conteúdo de M.O passou de  $0,2 \text{ dag.Kg}^{-1}$  para  $2,9 \text{ dag.Kg}^{-1}$ . Além disso, estudos realizados por Tarraf et al. (2017), comprovou que o FMA (*Septoglomus viscosum* (syn. *Glomus viscosum* )) aumentou a absorção de P quando foram inoculados na espécie *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae).

Em relação aos micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn), não foram observados grandes incrementos pela ação dos fungos ou da adubação orgânica, exceto para o ferro (Fe) que no tratamento CFSE apresentou valores elevados ( $1.044,4 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), quando comparados com os demais (TABELA 3.7). No que diz respeito aos micronutrientes boro (B) e zinco (Zn), os tratamentos com a presença do esterco (SFCE e CFCE) obtiveram os maiores conteúdos respectivamente, B ( $52,75$  e  $49,61 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), Zn ( $43,27$  e  $44,65 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ). Conforme Nikoli e Matisi (2011), os valores de micronutrientes no solo, dentre eles B e Zn, aumentam quando o mesmo é incrementado com adubo orgânico bovino, além de elevar as disponibilidades para o vegetal.

### 3.5 Teor, rendimento e constituintes de óleo essencial

Na Figura 3.5 estão representados o teor (%) e o rendimento (g. de OE.planta<sup>-1</sup>) de óleo essencial (OE) da erva-cidreira cultivados sob a influência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e da adubação orgânica em casa de vegetação. Não houve interação significativa para nenhuma das variáveis estudadas, porém as maiores médias de teor de óleo (FIGURA 3.4 A) foram observadas nos tratamentos com a presença de esterco (SFCE e CFCE), com 0,24 e 0,27%, respectivamente, diferindo estatisticamente dos sem esterco (SFSE e CFSE) que obtiveram as menores médias com 0,15 e 0,16%, respectivamente.

Figura 3.5 — Teor (%) e rendimento (g. de OE.planta<sup>-1</sup>) do óleo essencial de *M. officinalis* L. cultivada sob influência de FMAs e da adubação orgânica em casa de vegetação.



SE: Sem esterco; CE: Com esterco; SF: Sem fungo; CF: Com fungo. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o fator esterco e maiúsculas para fator fungo não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor, 2019.

O mesmo ocorreu para o rendimento do óleo (FIGURA 3.5 B), pois os tratamentos com adubação orgânica (SFCE e CFCE) tiveram as maiores médias, ambos com 0,01 (g. de OE. Planta<sup>-1</sup>). Os tratamentos sem adubação orgânica tiveram uma queda de 80% e 60% no rendimento de óleo essencial, respectivamente para SFSE e CFSE, quando comparado com os tratamentos com adubação. Com isso, comprova-se experimentalmente a exigência da *M. officinalis* em relação a adubação orgânica.

Esse melhor desempenho da produção de óleo essencial dos tratamentos com esterco citados anteriormente pode estar ligada a dois fatores. O primeiro em relação à disponibilidade de nutrientes ofertada pela adubação orgânica evidenciado na análise química do solo (TABELA 3.1). O segundo devido a maior produção de biomassa de folhas produzidas por esses tratamentos (TABELA 3.4).

Diversas pesquisas comprovaram os efeitos benéficos do uso da adubação orgânica no cultivo de plantas medicinais, especialmente em relação a produção de óleo essencial. No trabalho realizado por Brant (2008), a espécie *M. officinalis* L. apresentou as maiores médias de teor e rendimento quando foi aplicado esterco bovino, já as plantas sem o adubo orgânico demonstraram os menores valores. Arashiro et al. (2012) também verificaram que as doses de esterco bovino proporcionou maior rendimento de óleo essencial para a espécie *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae). Para a espécie *Mentha piperita* L. (Lamiaceae), as doses de esterco bovino aumentou o rendimento de óleo essencial em relação ao controle (COSTA et al., 2013).

Em relação ao teor do óleo essencial, as menores médias observadas nos tratamentos sem adubação orgânica (SFSE e CFSE) podem estar relacionada com a baixa disponibilidade de Ca, pois conforme Silva (2015) a ausência desse elemento (Ca) reduz cerca de 30-40% a produção de óleo em *Melissa officinalis*.

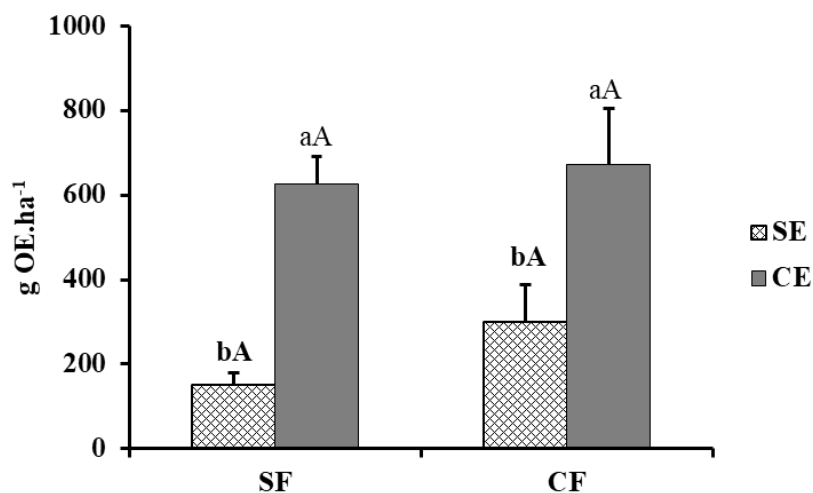
Não ocorreu diferenças significativas nos tratamentos com a presença dos FMAs, porém os mesmos apresentaram tendência de maiores médias de teor e rendimento (FIGURA 3.4) quando comparados com os sem fungos. Alguns estudos comprovam os efeitos positivos dos FMAs na produção de óleo essencial nas plantas medicinais como o de Karagiannidis et al. (2011). Esses autores comprovaram que a colonização de fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus etunicatum* e *G. lamellosum*) proporcionou maior teor de óleo essencial nas espécies da família Lamiaceae (orégano (*Origanum onites* L.) e menta (*Mentha viridis* L.)) em relação às plantas que não foram inoculadas. Urcoviche et al. (2015) evidenciaram também que a

simbiose entre os FMAs (*Glomus etunicatum* e *Rhizophagus clarus*) e a espécie *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) aumentou o teor de óleo essencial ao comparar com a mesma espécie sem os fungos.

Segundo Rasouli-Sadaghiani et al. (2010), os FMAs (*Glomus fasciculatum*, *Glomus etuonicatum* e *Glomus intricadum*) incrementaram níveis significativos de teor e rendimento de óleo essencial na espécie *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Conforme os mesmos autores, ainda são escassas as informações sob a influência dos fungos micorrízicos na produção de óleos essenciais, porém esse fenômeno pode está relacionado com aumento do sistema radicular e conseqüentemente na maior exploração do solo que os fungos proporcionam para as planta. Fato este observado na Tabela 3.4, pois os tratamentos com inoculação (CFSE e CFCE) apresentaram maior matéria seca de raiz em relação aos sem inoculação (SFSE e SECE), podendo ter ocasionado maior absorção de água e nutrientes, conseqüentemente causando a maior produção de matéria seca das folhas.

Na figura 3.6 estão apresentadas as médias de produtividade de óleo essencial da erva-cidreira cultivada sob a influência dos FMAs e da adubação orgânica. Para o cálculo de produtividade por hectare foi considerado um espaçamento de 0,4 x 0,4 m conforme o cultivo realizado por Silva et al. (2018). Observa-se que os tratamentos com adubação bovina apresentaram maiores produtividades por hectare, fato esse já espero, pois na Figura 3.4 os mesmos apresentaram maiores médias de teor e rendimento por planta. Santos et al. (2009) obtiveram maiores produtividades de óleo essencial de melissa por hectare nos tratamentos adubados quando comparados com o controle (sem adubo bovino). Zolfaghari et al. (2013) verificaram que os FMAs (*Funneliformis mosseae* (syn. *Glomus mosseae*), *G. fasciculatum* e *Rhizophagus intraradices* (syn. *G. intraradices*)) aumentaram a produção do óleo essencial na espécie *Ocimum basilicum* L. Confirmando que esses fatores, tando os FMAs e a adubação orgânica podem aumentar a produção de óleo essencial da erva-cidreira.

Figura 3.6 — Produtividade do óleo essencial de *M. officinalis* L. cultivada sob a influência dos FMAs e da adubação orgânica em casa de vegetação.



**SE:** Sem esterco; **CE:** Com esterco; **SF:** Sem fungo; **CF:** Com fungo. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o fator esterco e maiúsculas para fator fungo não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor, 2019.

Os constituintes químicos do óleo essencial da espécie *M. officinalis* L. cultivada sob a influência de FMAs e da adubação orgânica estão demonstrados na Tabela 3.8, sendo expressos em porcentagem (%) de área e concentração do analito (mg/mL), verifica-se que para todos os tratamentos foram identificados de 93 a 96,2% dos constituintes. No que diz respeito ao metabólito majoritário, todos os tratamentos obtiveram o citral (neral + geranial) como constituinte principal variando entre 66,85 a 72,09% da área relativa total. A única diferença qualitativa observada foi que nos tratamentos sem adubo (SFSE e CFSE) o nerol não estava presente à exceção dos tratamentos com esterco (SFCE e CFCE).

Em relação à classificação dos terpenos identificados, verifica-se que mais de 90% dos constituintes presentes no óleo essencial da erva-cidreira pertencem a classe dos monoterpenos.

Conforme Mehrafarin et al. (2015), a espécie *M. officinalis* L. cultivada sob influência de bioestimuladores apresentou como metabólitos majoritários os seguintes componentes: citronelal, neral,  $\delta$ -cadineno, germacreno e geranial. Argyropoulos e Müller (2014) observaram a presença em maior quantidade dos constituintes neral, geranial e citronelal na mesma espécie. Além dessa, outros estudos corroboram com os dados encontrados neste trabalho (ABDELLATIF et al., 2013; MAFAKHERI et al., 2016; NAJAFIAN, 2013).

Cardarelli et al. (2013) estudando o cultivo da planta medicinal *Aloe* spp., afirmam que o uso da adubação orgânica a base de esterco bovino, a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus irregularis* e *Funneliformis mosseae*) e a irrigação salina, podem ser ferramentas eficazes para alcançar perfis fitoquímicos mais favoráveis.

Tabela 3.8 — Constituintes químicos do óleo essencial de *M. officinalis* L. cultivada sob as influências de FMAs e da adubação orgânica em casa de vegetação.

| IR <sup>a</sup>                    | Constituintes          | Área do analito (%) ±DP |                   |                   |                   | Concentração do analito (mg/mL) ± DP |                  |                  |                   |
|------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|
|                                    |                        | SFSE                    | SFCE              | CFSE              | CFCE              | SFSE                                 | SFCE             | CFSE             | CFCE              |
| 976                                | Sabinene               | 0,52±0,01               | 0,45±0,06         | 0,54±0,01         | 0,38±0,06         | 0,05±0,00                            | 0,04±0,01        | 0,05±0,00        | 0,03 ±0,00        |
| 986                                | 6-Metil 5-hepten-2-ona | 0,78±0,01               | 0,92±0,20         | 0,50±0,06         | 0,64±0,01         | 0,07±0,00                            | 0,08±0,02        | 0,04±0,01        | 0,06 ±0,00        |
| 1144                               | Óxido de limoneno      | 0,54±0,01               | 0,93±0,25         | 0,55±0,07         | 0,63±0,07         | 0,05±0,00                            | 0,08±0,02        | 0,05±0,01        | 0,06 ±0,01        |
| 1153                               | Citronelal             | 8,02±0,04               | 15,98±1,48        | 11,81±1,28        | 14,44±2,45        | 0,75±0,00                            | 1,41±0,12        | 1,05±0,11        | 1,27 ±0,24        |
| 1183                               | Angelato de prenila    | 0,63±0,02               | 0,75±0,05         | 0,76±0,16         | 0,84±0,22         | 0,06±0,00                            | 0,07±0,00        | 0,07±0,01        | 0,07 ±0,02        |
| 1213                               | Citronelol             | 0,38±0,02               | 0,66±0,02         | 0,48±0,03         | 0,49±0,15         | 0,03±0,00                            | 0,06±0,00        | 0,04±0,00        | 0,04 ±0,01        |
| 1228                               | Nerol                  | nd                      | 0,27±0,02         | nd                | 0,14±0,19         | nd                                   | 0,02±0,00        | nd               | 0,01 ±0,02        |
| <b>1242</b>                        | <b>Neral</b>           | <b>31,25±0,07</b>       | <b>29,53±0,76</b> | <b>30,15±0,75</b> | <b>31,05±0,78</b> | <b>2,91±0,01</b>                     | <b>2,61±0,09</b> | <b>2,68±0,07</b> | <b>2,73 ±0,11</b> |
| 1253                               | Geraniol               | 0,28±0,02               | 0,81±0,07         | 0,47±0,07         | 0,50±0,18         | 0,03±0,00                            | 0,07±0,01        | 0,04±0,01        | 0,04 ±0,02        |
| 1258                               | Citronelato de metila  | 0,27±0,01               | 0,20±0,28         | 0,28±0,07         | 0,24±0,11         | 0,03±0,00                            | 0,02±0,02        | 0,02±0,01        | 0,02 ±0,01        |
| <b>1272</b>                        | <b>Geranial</b>        | <b>40,51±0,09</b>       | <b>37,32±0,09</b> | <b>41,94±0,05</b> | <b>40,41±0,96</b> | <b>3,77±0,01</b>                     | <b>3,30±0,02</b> | <b>3,73±0,00</b> | <b>3,56 ±0,14</b> |
| 1325                               | Geraniato de metila    | 1,08±0,03               | 0,89±0,01         | 0,87±0,09         | 0,77±0,22         | 0,10±0,00                            | 0,08±0,00        | 0,08±0,01        | 0,07 ±0,02        |
| 1358                               | Acetato de nerila      | 2,22±0,02               | 1,29±0,06         | 1,54±0,35         | 1,19±0,81         | 0,21±0,00                            | 0,11±0,01        | 0,14±0,03        | 0,10 ±0,07        |
| 1375                               | Acetato de geranila    | 6,16±0,09               | 4,26±0,35         | 4,72±1,07         | 3,60±1,72         | 0,57±0,01                            | 0,38±0,03        | 0,42±0,10        | 0,32 ±0,15        |
| 1583                               | Óxido de cariofileno   | 1,11±0,03               | 0,68±0,00         | 0,98±0,02         | 0,88±0,34         | 0,10±0,00                            | 0,06±0,00        | 0,09±0,00        | 0,08 ±0,03        |
| Total de Citral (neral + geranial) |                        | 71,76                   | 66,85             | 72,09             | 71,46             | 6,68                                 | 5,91             | 6,41             | 6,29              |
| Total                              |                        | 93,75                   | 94,94             | 95,59             | 96,2              | 8,73                                 | 8,39             | 8,5              | 8,46              |

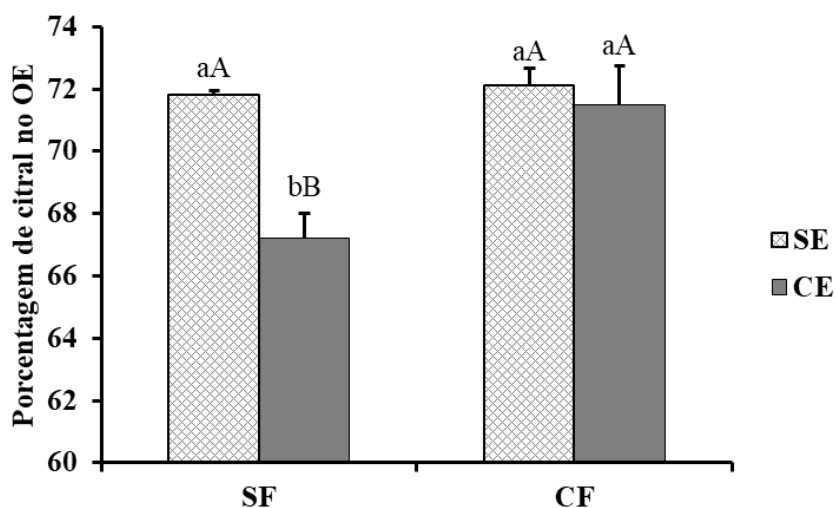
<sup>a</sup>Índice de retenção linear relativo a série n-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. **DP**: desvio padrão (*n*=3). **SFSE**: Sem fungo sem esterco. **SFCE**: Sem fungo com esterco. **CFSE**: Com fungo sem esterco. **CFCE**: Com fungo com esterco.

Fonte: Do autor, 2019.



Na Figura 3.7 estão demonstrados as médias do componente majoritário citral (neral + geranial) representado em porcentagem da área relativa do pico correspondente a esses analitos do óleo essencial de *M. officinalis* L. cultivada sob influência dos FMAs e da adubação orgânica. Verifica-se que ocorreu interação para ambos os fatores estudados. Não ocorreu diferenças significativas entre os tratamentos sem adubação orgânica (SFSE e CFSE), mas ao comparar esses tratamentos, observa-se que a maior média do constituinte citral ocorreu na presença da simbiose (CFSE), com de 72,09%. Já o sem inoculação (SFSE) apresentou a menor média com 71,76%.

Figura 3.7 — Média do constituinte majoritário (citral%) presente no óleo essencial de *M. officinalis* L. cultivada sob influência de FMAs e da adubação orgânica em casa de vegetação.



**SE:** Sem esterco; **CE:** Com esterco; **SF:** Sem fungo; **CF:** Com fungo. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o fator esterco e maiúsculas para fator fungo não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor, 2019.

Porém, quando os tratamentos com esterco são comparados, verifica-se que ocorreu diferença entre os mesmos, pois o colonizado por fungos (CFCE) foi maior significativamente (71,46%) em relação ao não colonizado (SFCE) que apresentou menor média (66,85%) em referência aos demais.

Pesquisas também evidenciam a influência dos FMAs na produção de constituintes químicos das plantas medicinais. A espécie *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) apresentou melhor crescimento e composição do óleo essencial quando foi inoculada por FMAs (Symbivit comercial e *Septoglomus viscosum* (syn. *Glomus viscosum*), comprovando que essa

prática pode ser uma estratégia promissora para melhorar o cultivo de espécies medicinais (TARRAF et al., 2017). Lima, Campos e Da Silva (2015) constataram novamente que a simbiose de fungos micorrízicos arbusculares (*Gigaspora albida*, *Acaulospora longula* e *Claroideoglosum etunicatum*) otimizou o crescimento e a produção de metabólitos secundários na espécie *Inga vera* Willd.

As micorrizas arbusculares (*Funneliformis mosseae*) melhoraram os conteúdos de éter, limoneno, carvona, iso-dihidrocarvona, miristicina, p-cimeno, decanal, 2-decenal e n-dihidrocarvona presente nos óleos essenciais das espécies *Trigonella foenum-graecum* L., *Coriandrum sativum* L. e *Nigella sativa* L. (WEISANY et al. 2017). Tarraf et al. (2015) afirmam que a inoculação micorrízica (*Funneliformis mosseae* (syn. *Glomus mosseae*) e *Septoglosum viscosum* (syn. *Glomus viscosum*)) pode ser uma tecnologia promissora no sistema agrícola sustentável para melhorar o desempenho da produtividade das plantas da família Lamiaceae: *Salvia officinalis* L., *Origanum vulgare* L., e *Thymus vulgaris* L., pois os inóculos foram eficientes para melhorar o perfil químico dos óleos essenciais.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a adubação bovina podem fornecer diferentes benefícios para a espécie *Melissa officinalis* L. Na ausência da adubação orgânica os FMAs proporcionam ganhos significativos de matéria seca. Já o uso da adubação orgânica no cultivo dessa espécie foi de grande importância para o aumento de biomassa e para produção de óleo essencial.

A simbiose estabelecida pelos FMAs na presença da adubação orgânica contribuiu significativamente no acúmulo dos constituintes principais neral e geranial (cital) presentes no óleo essencial de erva-cidreira.

Desta forma percebe-se que o uso da adubação orgânica influencia na produção de matéria seca, teor e rendimento do óleo essencial da erva-cidreira e a aplicação dos FMAs proporciona melhor qualidade do óleo pelo maior acúmulo de citral. Sugerindo que a combinação dessas práticas no cultivo dessa espécie pode potencializar a produção, proporcionando maior rendimento de matéria seca e elevado teor de princípio ativo.

## REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. **EXCLI journal**, v. 13, p. 772, 2014.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.1 ed (online). Illinois: Allured Publishing, 804 p. 2017.
- ALAGHEMAND, S. et al. Effects of organic fertilizers on growth and biochemical characteristics of Fenugreek. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 109, n. 2, p. 165-173, 2017.
- ARANGO, M. C. et al. Mycorrhizal fungi inoculation and phosphorus fertilizer on growth, essential oil production and nutrient uptake in peppermint (*Mentha piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 692-699, 2012.
- ANGELO, P. M; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos—Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARGYROPOULOS, D; MÜLLER, J. Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 118-124, 2014.
- ARASHIRO, Munique Polito et al. Efeito da Adubação Orgânica e da Consorciação no Rendimento de Biomassa e Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* L.. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 14, n. 1, 2012.
- BELTRANO, J; RONCO, M. G. Improved tolerance of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) to drought stress and rewatering by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum*: Effect on growth and cell membrane stability. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 1, p. 29-37, 2008.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: Funep, 1988.
- BERBARA, R. L. L; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. III-Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. **Nutrição mineral de plantas**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, p. 74-85, 2006.
- BETTONI, M. M. et al. Growth and production of onion cultivars in organic system in a nontraditional planting period. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p. 2139-2152, 2013.
- BRANT, R. S. **Características anatômicas, fisiológicas e de óleos essenciais de *Melissa officinalis* L.(Lamiaceae), em função da adubação orgânica, intensidade e qualidade de luz**. 2008. 138 p. Tese (Doutorado em Plantas Mediciniais Aromáticas e Condimentares). Universidade Federal de Lavras-MG. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normas climatológicas de 1961-1990**. Brasília, 992. 84 p. 1992.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Seminário de 10 anos da política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, DF, 2016. Disponível

em:<<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>>. Acesso em: 15 de nov. 2018.

BRESSAN, W. et al. Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 02, p. 315-323, 2001.

BRITO, M. A; MOMENTÉ, V. G; NASCIMENTO, I. R. Do. Teores de clorofila em plantas de hortelã-verde em função de diferentes níveis de adubação orgânica. **Seninário de Iniciação Científica**. Universidade Federal do Tocantins. P. 1-4, 2012.

CAMPRUBI, A. et al. Field Performance and Essential Oil Production of Mycorrhizal Rosemary in Restoration Low-Nutrient Soils. **Land Degradation and Development**, v. 26, n. 8, p. 793-799, 2015.

CARDARELLI, M. et al. Effects of fertilization, arbuscular mycorrhiza, and salinity on growth, yield, and bioactive compounds of two Aloe species. **HortScience**, v. 48, n. 5, p. 568-575, 2013.

CORRÊA, M. R. et al. Características anatômicas foliares de plantas de orégano (*Origanum vulgare* L.) submetidas a diferentes fontes e níveis de adubação orgânica. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, 2009.

COSTA, A. G. et al. Biomass production, yield and chemical composition of peppermint essential oil using different organic fertilizer sources. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 3, p. 202-210, 2013.

CUNHA, F. et al. HPLC-DAD phenolic profile, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activity of *Melissa officinalis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 9, p. 1664-1670, 2016.

CHEN, M. M. et al. C: N: P stoichiometry and specific growth rate of clover colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and soil**, v. 326, n. 1-2, p. 21-29, 2010.

CHEN, W. et al. Mechanisms by which organic fertilizer and effective microbes mitigate peanut continuous cropping yield constraints in a red soil of south China. **Applied Soil Ecology**, v. 128, p. 23-34, 2018.

DE ARAUJO, L. C. et al. Fontes de matéria orgânica como alternativa na melhoria das características químicas do solo e produtividade do capim-mombaça. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 6, n. 1, p. 65-72, 2008.

DE MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Hortic. bras**, v. 27, n. 2, 2009.

DE SOUSA, D. M. G; LOBATO, E. Adubação fosfatada em solos da região do Cerrado. **Fósforo na Agricultura Brasileira**, Yamada, T. and SRS Abdalla (Eds.), p. 157-196, 2004.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Embrapa Informação Tecnológica, p. 370, 2009.

EMPÓRIO SABOR DA TERRA. 2019. Disponível em:<

<http://www.emporiosabordaterra.com.br/cha-melissa.html>>. Acesso em: 11 de jan. 2019.

ENGEL, Rita et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and polyphenol profile of marjoram, lemon balm, and marigold. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 19, p. 3733-3742, 2016.

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

FREITAS, M. S. M; MARTINS, M. A; CARVALHO, A. J. C. D. Crescimento e composição mineral da menta em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada. **Hortic. bras**, v. 24, n. 1, 2006.

GANJALI, A.; KAYKHAI, M. Investigating the Essential Oil Composition of *Rosmarinus officinalis* Before and After Fertilizing with Vermicompost. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 20, n. 5, p. 1413-1417, 2017.

GERDEMANN, J. W; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological society**, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963.

GIRALDI, M; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

HARRISON, M. J. Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant/fungal symbioses. **Journal of Experimental Botany**, p. 1013-1022, 1999.

HAZZOUMI, Z. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and water stress on growth, phenolic compounds, glandular hairs, and yield of essential oil in basil (*Ocimum gratissimum* L). **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 2, n. 1, 2015.

HERRERA-PERAZA, R. A. et al. Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 35, n. 2, 2004.

HEITOR, L. C. et al. Growth and yield of marigold flowers in response to mycorrhizal inoculation and phosphorus. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 26-30, 2016.

HISCOX, J. D e ISRAELSTAM, G.F. 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, 1979.

HOFFMANN, L. V; LUCENA, V. S. Para entender Micorrizas Arbusculares. **Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

IOZI, R. N.; RODRIGUES, J. D.; GOTO, R.; ONO, E. O. Aplicação de ethephon em plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo* var. melopepo) cultivadas em casa de vegetação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 21, n. 1, p. 53-59, 2000.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A. et al. Anti proliferative properties of *Melissa officinalis* in different human câncer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 14, p. 5703-5707, 2015.

- JAKOBSEN, I; SMITH, S.E. e SMITH, F.A. **Function and diversity of arbuscular mycorrhizae in carbon and mineral nutrition.** In: van der HEIJDEN, M.G.A. e SANDERS, I., eds. *Mycorrhizal ecology*. Berlin, Springer-Verlag, (Ecological Studies, 157) p.75-92, 2002.
- JENKINS, W. R. et al. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant disease reporter**, v. 48, n. 9, 1964.
- JIANG, Y. et al. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. **Science**, p. 9970, 2017.
- KARAGIANNIDIS, N. et al. Effect of three Greek arbuscular mycorrhizal fungi in improving the growth, nutrient concentration, and production of essential oils of oregano and mint plants. **Scientia horticulturae**, v. 129, n. 2, p. 329-334, 2011.
- KIM, S. et al. Response surface optimised extraction and chromatographic purification of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* leaves. **Food chemistry**, v. 121, n. 2, p. 521-526, 2010.
- KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological research**, v. 92, n. 4, p. 486-488, 1989.
- LAMEIRA, O. A; PINTO, J. E B. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular.** Embrapa Amazônia Oriental, 1ª Ed. Belém-Pa, 34, p. 2008.
- LIMA, C. S; CAMPOS, Da S. M. A; DA SILVA, F. S. B. Mycorrhizal Fungi (AMF) increase the content of biomolecules in leaves of *Inga vera* Willd. seedlings. **Symbiosis**, v. 65, n. 3, p. 117-123, 2015.
- LIN, S. H. et al. A medicinal herb, *Melissa officinalis* L. ameliorates depressive-like behavior of rats in the forced swimming test via regulating the serotonergic neurotransmitter. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 266-272, 2015.
- MAFAKHERI, S. et al. Effect of bio and chemical fertilizers on the essential oil content and constituents of *Melissa officinalis* (Lemon Balm). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, n. 5, p. 1277-1285, 2016.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Potassa e do Fósforo, 1997. 319 p.
- MEHRAFARIN, A. et al. Phytochemical and morpho-physiological responses of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) to biostimulants Application. **Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 55, p. 29-42, 2015.
- MOREIRA, F. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2. ed. Lavras: Ed. da UFLA, 2006.
- MÜZELL, D. P. **Propriedades biológicas de extratos de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) em ratos wistar.** 2006. 70 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MCGONIGLE, T. P. et al. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. **New phytologist**, v. 115, n. 3, p. 495-501, 1990.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES F. O. M.; RODRIGUES, J. A. S. **Ecofisiologia**. In: RODRIGUES, J. A. S. (Ed.). Cultivo do sorgo. 5. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, p. 30, 2007.

NAJAFIAN, S. Rapid Extraction and Analysis of Volatile Oils Components of *Melissa officinalis* using Headspace and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Journal of herbs, spices & medicinal plants**, v. 19, n. 4, p. 340-347, 2013.

NATURITAS. 2019. Disponível em:< <https://www.naturitas.pt/oleos-essenciais/p/oleo-essencial-de-melissa-melissa-officinalis-bio-herbes-traditions-2-ml-fr/>>. Acesso em: 11 de jan. 2019.

NIKOLI, T; MATSI, T. Influence of liquid cattle manure on micronutrients content and uptake by corn and their availability in a calcareous soil. **Agronomy Journal**, v. 103, n. 1, p. 113-118, 2011.

NIST. **National Institute of Standards and Technology**. PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Gaithersburg, 2008.

PADMAVATHI, T.; RANJINI, R. Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on the growth of *Ocimum sanctum* and Glomalin a soil related protein. **Research Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 44-50, Nov 2011.

PEREIRA, L. S. et al. Cadmium induced changes in *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) grown on organically fertilized soil with reference to mycorrhizae, metabolism, anatomy and ultrastructure. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 150, p. 76-85, 2018.

PHILLIPS, J; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British mycological Society**, v. 55, n. 1, p. 158-161, 1970.

RASMUSSEN, S. R. et al. Intraradical colonization by arbuscular mycorrhizal fungi triggers induction of a lipochitoooligosaccharide receptor. **Scientific reports**, v. 6, p. 29733, 2016.

RASOULI-SADAGHIANI, M. et al. Effects of AM fungi on growth, essential oil production and nutrients uptake in basil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 21, p. 2222-2228, 2010.

RUSSOMANNO, O. M. R.; KRUPPA, P. C.; MINHONI, M. T. A. Influência de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de plantas de alecrim e manjeriço. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, p. 37-43, 2008.

SABERI, A. et al. The effects of methanolic extract of *Melissa Officinalis* on experimental gastric ulcers in rats. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 18, n. 7, 2016.

SAFAEIAN, L. et al. Protective effect of *Melissa officinalis* extract against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human vascular endothelial cells. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 5, p. 383-389, 2016.

SALES, J. F. et al. Acúmulo de massa, teor foliar de nutrientes e rendimento de óleo essencial de hortelã-do-campo (*Hyptis marruboides* Epl.) cultivado sob adubação orgânica. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 1, 2009.

SANTOS, M. da F. et al. Esterco bovino e biofertilizante no cultivo de erva-cidreira-verdadeira (*Melissa officinalis* L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.4, p.355-359, 2009.

SILVA, T. C. **Produção de biomassa, teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob omissão de nutrientes e em consórcio com *Achillea millefolium* L.** 2015. 99 p. Dissertação (Mestrado em Plantas Mediciniais Aromáticas e Condimentares). Universidade Federal de Lavras-MG. 2015.

SILVA, T. C. et al. The growth, photosynthetic pigments and essential oil composition of monocropped and intercropped lemon balm with yarrow. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, 2018.

SOARES, A. C. F. et al. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição de mudas de jenipapeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 47-54, 2012.

SODRÉ, A. C. B. et al. Organic and mineral fertilization in lemon balm. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 147-152, 2013.

STANCATO, G. C; SILVEIRA, A. P. D da. Associação de fungos micorrízicos arbusculares e cultivares micropropagadas de antúrio. **Bragantia**, v. 65, n. 3, p. 511-516, 2006.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª Ed. Artmed Edit, p. 700, 2017.

TARRAF, W. et al. Effects of mycorrhiza on growth and essential oil production in selected aromatic plants. **Italian Journal of Agronomy**, v. 10, n. 3, p. 160-162, 2015.

TARRAF, W. et al. Influence of arbuscular mycorrhizae on plant growth, essential oil production and phosphorus uptake of *Salvia officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 102, p. 144-153, 2017.

TROUVELOT, A. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. **Physiological and genetical aspects of mycorrhizae**, p. 217-221, 1986.

URCOVICHE, R. C. et al. Plant growth and essential oil content of *Mentha crisper* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of phosphorus. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 103-107, 2015.

VAN DEN DOOL, H. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

WEISANY, W. et al. *Funneliformis mosseae* fungi changed essential oil composition in *Trigonella foenum graecum* L., *Coriandrum sativum* L. and *Nigella sativa* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 3, p. 276-287, 2017.



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

XU, J. et al. Soil improvement promoted micro-ecology of farmlands for ginseng cultivation. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 42, n. 5, p. 875-881, 2017.

ZOLFAGHARI, M. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and essential oil content and composition of *Ocimum basilicum* L. **Plant physiology**. v. 3, n. 2, p. 643-650, 2013.

ZHU, Y.G; Miller, R. M. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. **Trends in plant science**, v. 8, n. 9, p. 407-409, 2003.

**CAPÍTULO IV**  
**INFLUÊNCIA DOS FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E DA**  
**ADUBAÇÃO ORGÂNICA NAS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E DO POTENCIAL**  
**ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *Melissa officinalis* L. (LAMIACEAE)**

## RESUMO

*Melissa officinalis* L. é originária da Europa e Ásia, e o seu óleo essencial possui diversos efeitos terapêuticos como: antifebril, antimicrobianos, inseticidas e antioxidantes. Os metabólitos são afetados por diversos fatores, tanto abióticos quanto bióticos. Objetivou-se avaliar a influência dos FMAs e da adubação orgânica bovina nos constituintes (fenóis e flavonóides) e potencial antioxidante. O arranjo experimental foi organizado em Delineamento Inteiramente Casualizado - DIC em esquema fatorial 2 x 2 (com/sem fungos – CF/SF; com/sem esterco – CE/SE) totalizando quatro tratamentos T1 (SFSE), T2 (SFCE), T3 (CFSE) e T4 (CFCE). Para quantificação dos constituintes fenólicos no extrato foram aplicados os testes de determinação do teor de fenóis totais (DTFT) e teor de flavonoide. E para as atividades antioxidantes do óleo e do extrato foram empregados as análise da capacidade antioxidante total (CAT) e a Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre (DPPH). O uso do solvente hidroetanólico (50%) por dois ciclos de 15 minutos proporcionou melhor extração de substâncias fenólicas. Os tratamentos sem esterco (CFSE e CFCE) se destacaram em relação aos demais, por apresentar, respectivamente, as maiores médias significativas de fenóis totais (136,45 e 135,26 mg de EAG . g de folha seca<sup>-1</sup>). Para a capacidade antioxidante total (CAT) não houve influência dos FMAs, mas os tratamentos sem adubação (SFSE e CFSE) demonstraram maior atividade, com médias de, 11,96 e 11,75 mg de EAA.g<sup>-1</sup> de folha seca respectivamente. A espécie *M. officinalis* L. sofre influência tanto dos fungos micorrízicos arbuscular (FMAs) como da adubação bovina no acúmulo de constituintes fenólicos. A colonização com fungos micorrízicos proporcionou principalmente o acúmulo de fenóis totais em relação aos não inoculados. Portanto, a erva-cidreira demonstrou sensibilidade aos fatores de adubação e fungos, apresentando defesa antioxidante conforme os testes empregados, sendo que tanto os extratos quanto o óleo essencial conferiam atividade antioxidante.

**Palavras-chaves:** Otimização extrativa. Extrato. Fenóis Totais

## ABSTRACT

*Melissa officinalis* L. which is native to Europe and Asia, and its essential oil has several therapeutic effects such as antifebrile, antimicrobial, insecticide, and antioxidants. The metabolites are affected by several factors, both abiotic and biotic. The objective was to evaluate the influence of AMFs and organic bovine fertilization on the chemical constituents and antioxidant potential. The experimental arrangement was organized in a completely randomized design (DIC) in a 2 x 2 factorial scheme (with / without fungi - CF / SF, with / without manure - CE / SE), totalizing four treatments T1 (SFSE), T2 (SFCE), T3 (CFSE) e T4 (CFCE). For the quantification of the phenolic constituents in the extract, the tests for determination of total phenol content (DTFT) and flavonoid content were applied. For the antioxidant activities of the oil and extract, the analysis of the total antioxidant capacity (CAT) and the determination of the total antioxidant activity by the free radical capture (DPPH) were used. The use of a hydroethanolic solvent (50%) for two cycles of 15 minutes provided the best extraction of phenolic substances. The non-manure treatments (CFSE and CFCE) stood out in relation to the others as they presented, respectively, the highest significant mean values of total phenols (136,45 and 135,26 mg of EAG . g of dry leaf<sup>-1</sup>). For the total antioxidant capacity (TAC) there was no influence of the AMF, but the treatments without fertilization (SFSE and CFSE) showed higher activity, with averages of 11,96 and 11,75 mg of EAA . g of dry leaf<sup>-1</sup>, respectively. The *M. officinalis* L. species was influenced both by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and by bovine fertilization in the accumulation of phenolic constituents. The colonization with mycorrhizal fungi provided mainly the accumulation of total phenols in relation to those not inoculated. Therefore, lemongrass showed sensitivity to fertilization and fungi factors, presenting antioxidant defense according to the tests used, both extracts and essential oil conferring antioxidant activity.

**Key-words:** Extraction optimization. Extract. Total Phenols.

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de oxidação é importante para os organismos aeróbicos e para o metabolismo. Os radicais livres classificados como espécies reativas de oxigênio (ERRO) são gerados naturalmente como produto dessa ação de oxidação ou por uma disfunção biológica (SÁ et al., 2012). Diversas pesquisas vêm sendo realizadas em relação às plantas medicinais que apresentam potencialidades para atividades antioxidantes, tal fato se deve por que os antioxidantes estão diretamente ligados ao combate de moléculas instáveis (radicais livres) que geram efeitos indesejáveis nas células do organismo. De acordo com Müzell (2006), dentre as atividades biológicas descritas para as substâncias fenólicas, existem relatos dos efeitos hepatoprotetor, nefroprotetor e nas propriedades anti-inflamatórias atribuídas à ação antioxidante deste grupo de moléculas.

Estudos científicos recentes demonstram que o óleo essencial de *Melissa officinalis* L. possui diversos efeitos terapêuticos como: antifebril, antimicrobianos e inseticidas (EBADOLLAHI et al., 2016; ABDELLATIF et al., 2014; SERTKAYA et al., 2013).

Várias pesquisas científicas demonstram resultados promissores do uso de plantas medicinais como antioxidantes. Safaeian et al. (2016) verificaram que o extrato de *Melissa officinalis* L. apresentou efeitos antioxidantes e citoprotetores contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células endoteliais da veia umbilical humana. Outras espécies medicinais avaliadas com potencial antioxidante nos últimos anos são: *Matricaria recutita* L., *Valeriana jatamansi* Jones; *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett., *Inga vera* Willd., *Ocimum basilicum* L. (GUPTA, SAIKIA e PANDEY, 2017; JUGRAN et al., 2015; LIMA et al., 2017; LIMA, CAMPOS e DA SILVA, 2015; TOUSSAINT, SMITH e SMITH, 2007).

Os teores e quantidades de óleo essencial produzido pelas plantas medicinais são afetados por diversos fatores, tanto abióticos quanto bióticos. Conforme Pinto e Bertolucci (2002), a planta não se comporta da mesma maneira no período do ano. Ela sofre alterações e, com isso, a concentração dos princípios ativos pode variar ao longo das estações. Fatores externos, como temperatura, pluviosidade, vento, solo, latitude, altitude e época estacional, interferem, de forma significativa, na elaboração desses compostos.

Dentre os diversos fatores abióticos que influenciam na produção de metabolitos secundários a adubação orgânica vem se destacando entre as pesquisas, já que por meio deste manejo se consegue aprimorar as características físicas, químicas e biológicas do solo,

proporcionando melhores condições para o crescimento e desenvolvimento do vegetal. Além disso, o uso dos resíduos animais é uma prática aplicada em todo o mundo, por resultar na manutenção da matéria orgânica e conseqüentemente disponibilizando de forma eficaz e segura a recuperação de nutrientes (AZEEZ e VAN AVERBEKE, 2010). Os autores Skubij e Dzida (2016) afirmam que adubação orgânica melhorou significativamente a quantidade de N-total e proteína na planta, além de obterem maior quantidade de ácido ascórbico na espécie *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae).

Outro ponto que vem sendo observado é o uso de FMAs nos cultivos de plantas medicinais, pois conforme Hoffmann e Lucena (2006), as hifas dos FMAs funcionam como extensão das raízes das plantas, já que devido à sua grande capacidade de ramificação, exploram o solo de forma mais abrangente, realizando absorção de água e nutrientes minerais, que são transferidos para as plantas por meio de estruturas intracelulares, efêmeras, denominadas arbúsculos. Em troca, a planta transfere ao fungo fotoassimilados.

Estudos realizados por Oliveira, Campos e Silva (2014), mostraram que a colonização de micorriza arbusculares em mudas de *Passiflora alata* Curtis. é uma alternativa para maximizar a produção de biomoléculas foliares farmacologicamente importantes, especialmente flavonoides.

Apesar dos estudos já realizados com a espécie, o uso de fungos micorrízicos arbusculares no cultivo desta ainda são poucos investigados, principalmente, em relação a produção de metabolitos secundários. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos FMAs e da adubação orgânica orgânica nos constituintes químicos e no potencial antioxidante da espécie *Melissa officinalis* L.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local do experimento e material vegetal**

O experimento foi desenvolvido, em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras-UFLA, no município de Lavras, situado na região Sul do estado de Minas Gerais, a 918,87 metros de altitude, latitude de 21°14'S e longitude de 45°00'W GRW. De acordo com a classificação climática de Köppen, o clima regional é do

tipo Cwa, mas apresenta características de Cwb, com duas estações bem definidas, uma fria e seca, de abril a setembro e outra quente e úmida, de outubro a março (Brasil, 1992).

As exsiccatas da espécie estudada estão depositadas no Herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA e correspondem ao nº 22155. As mudas de melissa foram produzidas por meio de microestacas apicais de aproximadamente 4-5 cm de comprimento, sendo que as mesmas foram colocadas para enraizar em bandejas de poliestireno de 128 células, contendo substrato comercial Plantmax®. As plântulas ficaram em estufa com 60% de sombreamento e, posteriormente, foram aclimatizadas por meio do aumento gradativo da intensidade luminosa.

## 2.2 Implantação do experimento

O substrato utilizado foi composto de Latossolo vermelho distrófico de textura argilosa e areia na proporção de 2:1 (solo:areia), sendo adicionado 9 kg.m<sup>-2</sup> de esterco bovino conforme a recomendação de Brant (2008). Este substrato foi esterilizado em autoclave, por um período de uma hora, com temperatura de 120°C sobre uma pressão de 1atm. Após 24h este processo foi repetido.

Os sólo-inóculos dos FMAs inoculados foram cedidos pela Coleção de Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) da Universidade Federal de Lavras - UFLA com os seguintes códigos de identificação: UFLA 314: *Scutellospora heterogama* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F.E. Sanders; UFLA 212: *Claroideoglossum etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler e UFLA 01: *Acaulospora morrowiae* Spain & N.C. Schenck. Sendo que foram utilizados cerca de 150 esporos de cada espécie de FMAs por vaso. Nos tratamentos sem inoculação foram aplicados 10 mL de suspensão de inóculo filtrada em malha de 0,045mm para reter os esporos de FMAs.

Após 30 dias de aclimatização, foram selecionadas as mudas de *M. officinalis* L. que apresentaram entre 3 a 4 pares de folhas. Posteriormente as plantas foram transplantadas em vasos de 6 dm<sup>3</sup>, onde foram aplicados os tratamentos, que consistiram de dois fatores. O primeiro fator (biótico) que foi a inoculação ou não de FMAs (*Scutellospora heterogama*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Acaulospora morrowiae*), em siglas respectivamente CF (com fungo) e SF (sem fungo). O segundo fator (abiótico) em relação a adubação orgânica a base de esterco bovino, com (CE) e sem (SE) a presença do mesmo, totalizando quatro tratamentos (SFSE), (SFCE), (CFSE) e (CFCE).

Desta forma, o arranjo experimental foi organizado em Delineamento Inteiramente Casualizado - DIC em esquema fatorial 2 x 2 ( com/sem fungos; com/sem estercos), contendo 5 repetições, com 6 plantas por repetição, totalizando 120 unidades experimentais, ou seja, 120 plantas. A irrigação foi realizada de forma manual de 2-3 vezes na semana, com auxílio de um becker de 500 mL. Após 90 dias do transplante as folhas de *M. officinalis* foram colhidas e secas em estufa de circulação de ar a 39°C até o material atingir peso constante.

### 2.3 Otimização extrativa

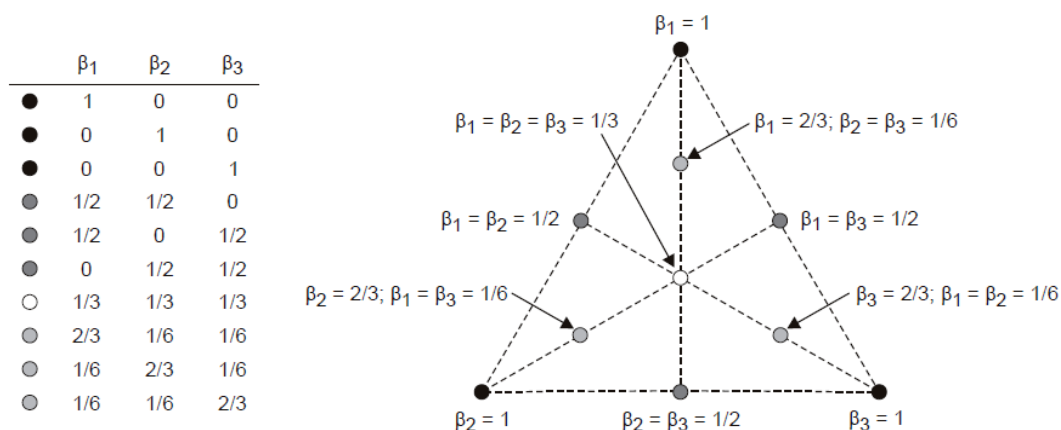
Os solventes acetona, água e etanol são amplamente utilizados na extração de compostos fenólicos (BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATO, 2014). Conforme a pesquisa de Khoddami, Wilkes e Roberts (2013) a escolha do solvente (dentre eles acetona, água e etanol) influencia diretamente nos rendimentos de compostos fenólicos extraídos. Os mesmos autores também argumentam que a escolha do solvente pode variar conforme a espécie estudada. No caso da família lamiaceae, algumas pesquisas já evidenciam o uso desses solventes para obter os melhores rendimentos de compostos fenólicos (BARCHAN et al., 2014; BRAHMI et al., 2012; PITARO; FIORANI; JORGE, 2012).

Para verificar qual a melhor mistura entre os três solventes (água-A, etanol-E e acetona-Ac) utilizados na otimização, foi usado o modelo de Montgomery (2006), pois são comumente usados para experimentos de extração com misturas. Esse modelo abrange os delineamentos simplex-lattice e simplex-centróide. Ambos avaliam a superfície de resposta triangular nos vértices (ou seja, os cantos do triângulo) e os centróides (lados do triângulo).

No projeto simplex-centróide, diferentes condições testadas formam um triângulo, com componentes puros no vértice, representando 100% de um de cada solvente. Pontos médios em cada lado representando permutações das combinações binárias (1/2: 1/2: 0; 1/2: 0: 1/2; 0: 1/2: 1/2) e, o ponto central como mistura ternária (1:3; 1:3; 1:3). Este desenho é por vezes aumentado com pontos interiores (pontos axiais) representando 2/3 de um dos solventes e 1/6 para os outros (Figura 4.1), também conhecido como Designer Axial simplex (DAS) (SAMPAIO et al., 2015).



Figura 4.1 — Designer axial simplex (DAS).



$\beta_1$  (água);  $\beta_2$  (Etanol);  $\beta_3$  (Acetona).

Fonte: Sampaio, 2015.

Desta forma, o delineamento simplex-centróide com pontos axiais em três repetições (FIGURA 4.1) foi escolhido para determinar a combinação de solventes de água, etanol e acetona. A Figura 1 apresenta todas as condições testadas. Esse desenho permitiu a avaliação de modelos lineares (água (A), etanol (E) e acetona (Ac)), quadráticos (A:E, A:Ac, e E:Ac) e especiais cúbicos (A:E:Ac) para a resposta em estudo.

Para o processo da otimização extrativa foram empregadas 50 mg de folhas pulverizadas de *M. officinalis*, as quais foram extraídas por sonicação com 1 mL do solvente ou misturas dos solventes. Foram empregados três ciclos de extração por 15 minutos, sendo que o solvente foi renovado em cada ciclo. Na transição de um ciclo de sonicação para o outro, o extrato foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. Cada sobrenadante recolhido representou uma amostra avaliada. Para cada solvente ou mistura de solvente o procedimento extrativo foi realizado em triplicata.

## 2.4 Obtenção das amostras

### 2.4.1 Preparo das amostras para avaliação dos compostos fenólicos de *M. officinalis*

O preparo dos extratos foi definido a partir do experimento de otimização extrativa (item 2.3). Em síntese, 50 mg de folhas pulverizadas de *M. officinalis* foram pesadas diretamente em microtubos, sendo extraídas com 1 mL de solução hidroetanólica a 50%. O método de extração empregado foi por sonicação, empregando-se três ciclos de 15 minutos,

com renovação do solvente efetuada a ciclo de extração. Na transição de um ciclo de sonicação para o outro, o extrato foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. Após essa etapa as amostras do primeiro, segundo e terceiro ciclo foram reunidas e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida, logo após a evaporação do solvente as amostras foram resuspendida com 1mL de solução hidroetanólica 50%, obtendo-se por fim um extrato com concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### **2.4.2 Obtenção do óleo essencial**

Os óleos essenciais de *M. officinalis* foram extraído por hidrodestilação em aparelho modificado de Clevenger, a partir de 40g de folhas secas em balão volumétrico de 2000 mL, contendo 1000 mL de água destilada. O tempo de extração foi de 90 minutos, considerado a partir do início da fervura.

Posteriormente realizou-se partição líquido-líquido, em funil de separação, do hidrolato com três porções de 25mL de diclorometano, para a purificação do óleo essencial as frações orgânicas foram reunidas e tratadas com sulfato de magnésio anidro, seguida de filtração simples e evaporação do solvente orgânico sob capela de exaustão de gases.

O armazenamento do óleo foi em frascos âmbar hermeticamente fechados e mantidos em geladeira a 4°C, até a realização das análises químicas. Todas as leituras dos testes químicos (óleo e extrato) foram realizadas em triplicata, pelo leitor de microplacas TECAN Infinity® M200 PRO operado pelo software Icontrol® version 3.37.

### **2.5 Quantificação de compostos fenólicos**

#### **2.5.1 Determinação do Teor de Fenólicos Totais (FT)**

A determinação do conteúdo total de fenóis foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, determinado pelo método de Slinkard e Singleton (1977). Em microtubos foi adicionado 20 µL do extrato hidroetanólico a 50% das folhas em uma concentração de 50 mg. mL<sup>-1</sup> em seguida colocados 120 µL de reagente de Folin – Ciocalteu (10% v/v) e 120 µL de carbonato de sódio (7% p/v). Após 2 h de reação à temperatura ambiente e no escuro, a absorbância foi medida a 760 nm.

A curva de calibração foi gerada a partir do padrão de ácido gálico na faixa de concentração de 0,008 a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de água destilada ( $y = 5,2278x + 0,1364$   $R^2 = 0,9992$ ). A apresentação dos resultados foram em mg Equivalente de Ácido Gálico (EAG). g de folha seca<sup>-1</sup>.

### **2.5.2 Capacidade antioxidante total (CAT) pelo método de redução do molibdato de amônio**

A capacidade antioxidante total (CAT) foi realizada com algumas modificações conforme a metodologia de Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Em microtubos de 1,5 mL foram adicionadas 50 µL de óleo em uma concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> em seguida foi adicionado 1000 µL do reagente molibdato, (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio monobásico 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Findado está etapa, as amostras permaneceram em banho-maria por 90 minutos a 95°C, após isso as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente. Em seguida um volume de 100 µL das amostras foi transferido para os poços de uma microplaca, sendo a leitura da absorbância realizada em 695nm. O mesmo processo foi realizado com o extrato hidroetanólico 50%, porém com uma concentração de 50 mg. mL<sup>-1</sup>.

A curva de calibração gerada tanto para o óleo quanto para o extrato, foi a partir do padrão de ácido ascórbico nas respectivas faixas de concentração: 0,008 a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> ( $y = 7,0955x + 0,1323$   $R^2 = 0,9975$ ) e 0,008 a 1 mg.mL<sup>-1</sup> ( $y = 3,1649x + 0,1291$   $R^2 = 0,9932$ ). Os resultados foram apresentados em mg Equivalente de Ácido Ascórbico (EAA). g de folha seca<sup>-1</sup>.

### **2.5.3 Teor de Flavonoides (TF)**

Os teores de flavonoide foram quantificados conforme descrito por Woisky e Salatino (1998), com modificação. Em microplacas foram adicionados 100 µL do extrato hidroetanólica a 50% das folhas em uma concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>, em seguida foram acrescentado 100 µL de solução de cloreto de alumínio (10% p/v). O branco foi preparado utilizando 100 µL da amostra e 100 µL de álcool 70%. Após 40 minutos, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em uma absorbância de 420 nm.

A curva de calibração foi gerada a partir do padrão de quercetina na faixa de concentração de 0,008 a 0,12 mg.mL<sup>-1</sup> álcool 70% ( $y = 18,92x + 0,1097$   $R^2 = 0,9913$ ). Os resultados foram apresentados como mg Equivalente de Quercetina (EQ). g de folha seca<sup>-1</sup>.

#### **2.5.4 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre 2,2difênil-1-picril-hidrazila (DPPH)**

O ensaio foi determinado pela captura do radical livre DPPH segundo o método de Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações. Alíquotas de 25 µL do extrato hidroetanólico (50%) das folhas de *Melissa officinalis* L. em uma concentração de 0,039 a 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> de solução foram misturadas a 275 µL de DPPH. Para o óleo essencial foi usado o mesmo procedimento, porém com uma concentração de 0,3 a 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Após 60 minutos foi realizada a leitura a 517 nm.

Para o controle utilizou 25 µL de solução hidroetanólica 50% e 275 µL de DPPH, o branco foi realizado com 25 µL da amostra e 275 µL de etanol (92,8 %). Tanto para o controle, como para o branco, após 60 minutos foi realizada a leitura a 517 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata. A curva de calibração foi gerada a partir do padrão BHT (3,5-di-tert-4-sutilhidroxitolueno) na faixa de concentração de 0,003 a 0,005 mg.mL<sup>-1</sup> de etanol (92,8%) ( $y = 8038,3x + 14,735$   $R^2 = 0,98$ ). Os resultados foram expressos em % IC50 (mg. mL<sup>-1</sup> de extrato), segundo a Equação:

$$\% \text{ IC50} = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

onde, Ac: absorbância controle ; At: absorbância teste (amostra).

#### **2.6 Análise estatística**

Os dados coletados foram submetidos aos testes de normalidade e submetidos à análise de variância pelo teste F. As médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sistema para Análise de Variância SISVAR (FERREIRA, 2014).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Otimização extrativa

Os resultados dos efeitos da otimização e suas interações na forma de análise de variância (ANOVA) estão apresentados no Apêndice B, com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Embora a falta de ajuste tenha sido significativa ( $p < 0,05$ ) para as variáveis nos três tempos de extração, o modelo quadrático e cúbico foram ajustados com probabilidade significativa ( $p < 0,05$ ).

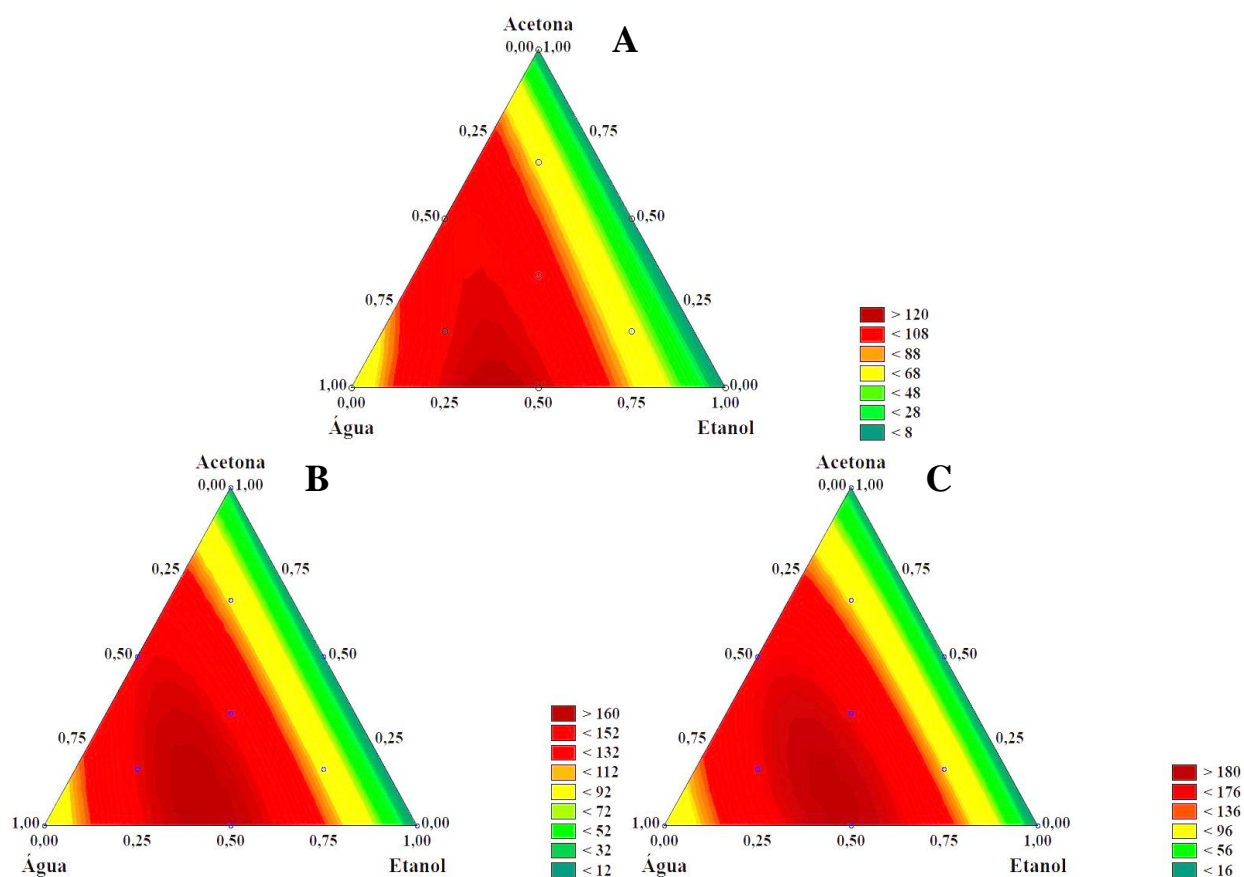
Para os fenóis totais aplicou-se Anova com ajuste aos modelos linear e quadrático, sendo o valor do  $R^2$  de 0,28 e 0,99, respectivamente. Assim, o modelo quadrático foi o melhor em prever o comportamento da mistura.

Porém para a capacidade antioxidante total a Anova foi aplicada com ajuste aos modelos linear, quadrático e cúbico, com  $R^2$  de 0,25, 0,65 e 0,90, respectivamente. Neste caso, para essa variável o modelo cúbico foi o mais adequado.

Os gráficos de contorno obtidos para os constituintes fenólicos pelo design da mistura em função da composição percentual de água, etanol e acetona, para os três tempos de extração, são ilustradas na Figura 4.2.

O maior valor no gráfico de contorno (Figura 4.2) para os três ciclos ocorreu entre as posições: água / etanol (50%), água / etanol / acetona (2/3: 1/6: 1/6) e água / etanol / acetona (1/2: 1/2: 1/2). Observou-se também que para *Melissa officinalis* L os solventes etanol (100%) e acetona (100%) quando usados de forma pura resultam em menores quantidades extraídas de substâncias fenólicas em relação à água pura. Isso pode ter ocorrido devido às diferenças de polaridade entre os solventes. Santos Felix et al. (2018), estudando os resíduos agroindustriais de bagaço de maçã *Spondias mombin* L., ratificaram que os menores teores de compostos fenólicos foram obtidos nos solventes de acetona (100%), etanol (100%) ou mistura 50% acetona / 50% etanol, enquanto os maiores foram obtidos somente com água ou mistura de água e acetona / etanol.

Figura 4.2 — Curva de contorno (A: 1x15 min, B: 1x15 min, C: 3x15 min) para rendimentos de constituintes fenólicos totais.



Fonte: Do autor, 2019.

A mistura dos solventes etanol / acetona (a 50%) resultaram em baixas quantidades de substâncias fenólicas extraídas para espécie erva-cidreira. Também verificou-se que os solventes etanol e acetona em mixtura com água proporcionaram maior extração de fenóis, sendo que o solvente água / etanol na proporção de 50% demonstrou maior capacidade de extração dos constituintes fenólicos Figura 4.2 (vermelho mais acentuado). Brahmi et al. (2012) corroboram com estes resultados, pois o extrato etanólico (a 50%) apresentou a maior quantidade de substâncias fenólicas para espécie *Mentha spicata* L. (Lamiaceae). Dados similares também foram encontrados por Ballesteros, Teixeira e Mussatto (2014), pois o extrato etanólico (a 60%) foi eficiente para extrair constituintes fenólicos do café (*Coffea* spp.).

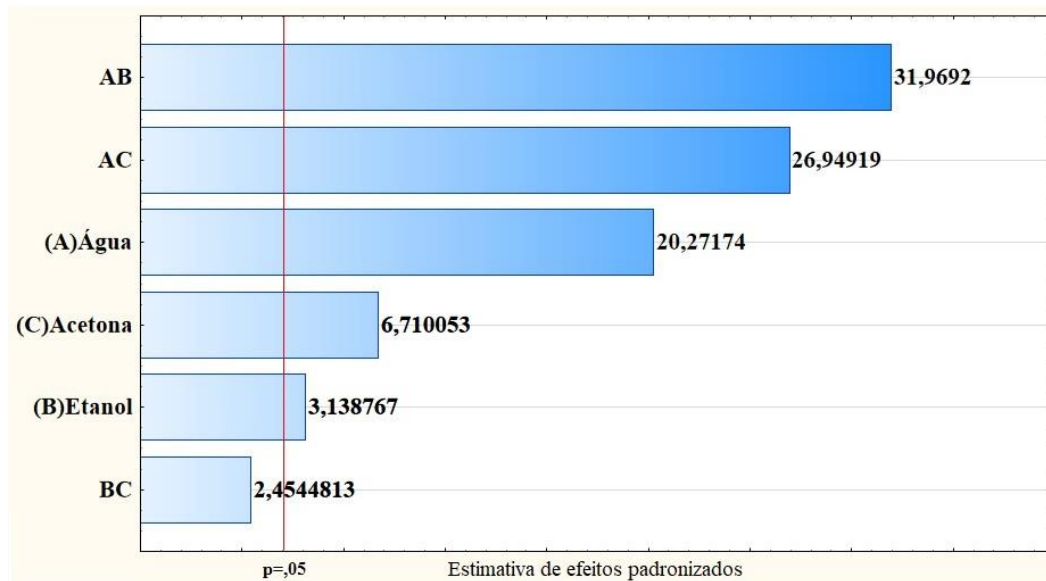
Neste caso, para a espécie *M. Officinalis* as maiores quantidades de fenóis totais podem ser esperadas para misturas mais ricas em água. Isso mostra que o rendimento de

extração aumenta com o aumento da polaridade do solvente usado na extração. Barchan et al. (2014) comprovaram que o uso de solventes polares (como água e metanol) foram importantes para obtenção de extratos ricos em fenóis totais e atividades antioxidantes nas espécies de *Mentha* spp. (Lamiaceae) mesma família botânica da espécie em estudo.

Para examinar a importância relativa dos principais efeitos e suas interações com significância estatística ( $p < 0,05$ ), foi empregado um gráfico de Pareto padronizado (FIGURA 4.3). De acordo com a Figura 4.3, os principais fatores Água (A), Etanol (B), Acetona (C) e suas interações (AB e AC) que se estendem além da linha de referência foram significativos ao nível de 0,05. Já a interação binária entre etanol e acetona não foi significativa.

A mistura de água e etanol (AB) demonstrou o efeito mais significativo na extração de substâncias fenólicas, seguida da interação com acetona (AC). A água (A) pura, bem como a acetona e etanol também se mostraram significativos. Porém a mistura de etanol e acetona (BC) apresentou valor não significativo.

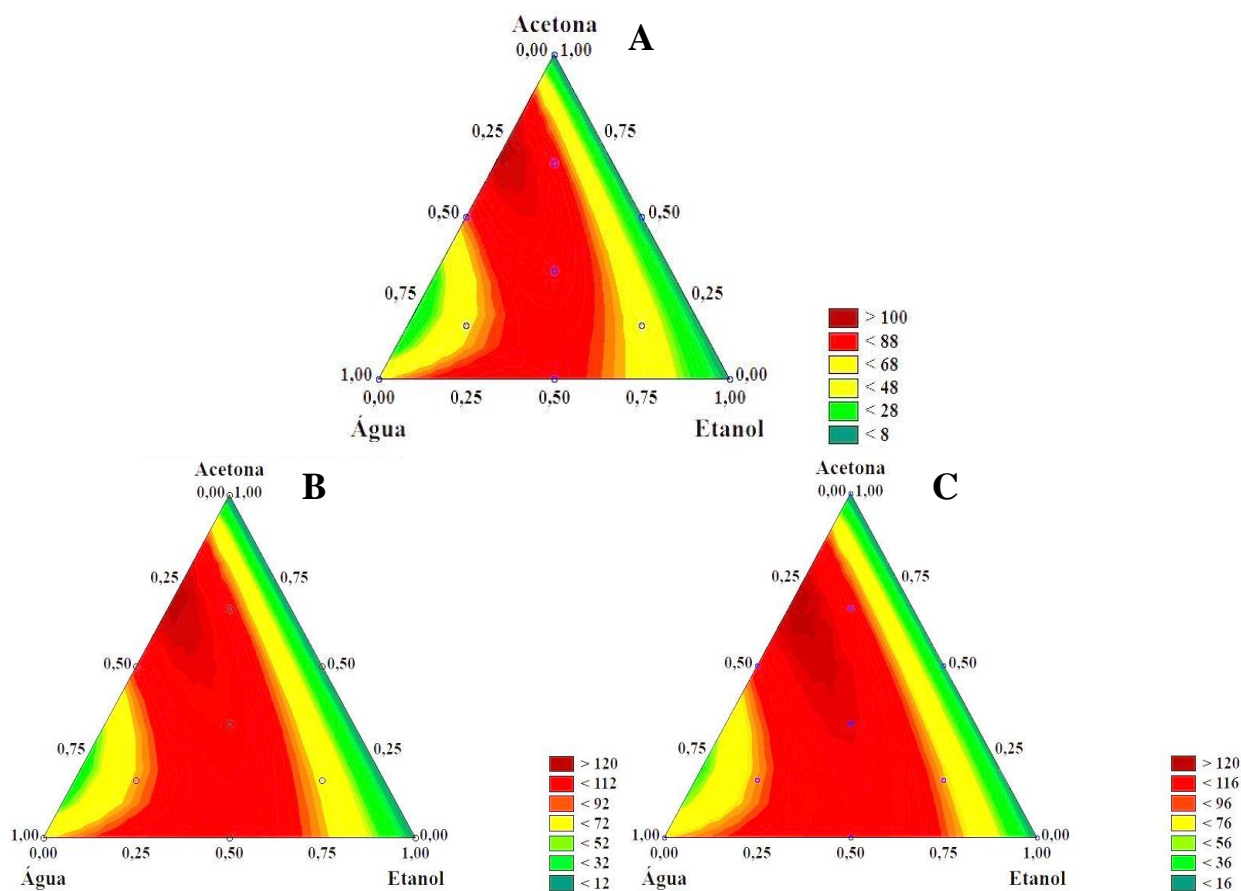
Figura 4.3 — Análise do gráfico de pareto dos efeitos padronizados para os fenóis totais.



Fonte: Do autor, 2019.

O gráfico de contorno para capacidade antioxidante total (CAT) em função da composição percentual de água, etanol e acetona são mostrados na Figura 4.4. Observam-se variações nos resultados obtidos quando comparados com os fenóis totais, pois quanto mais substâncias fenólicas presente no extrato, mais alta tende ser a capacidade antioxidante.

Figura 4.4 — Curva de contorno (A: 1x15 min, B: 1x15 min, C: 3x15 min) para a capacidade antioxidante total (CAT).



Fonte: Do autor, 2019.

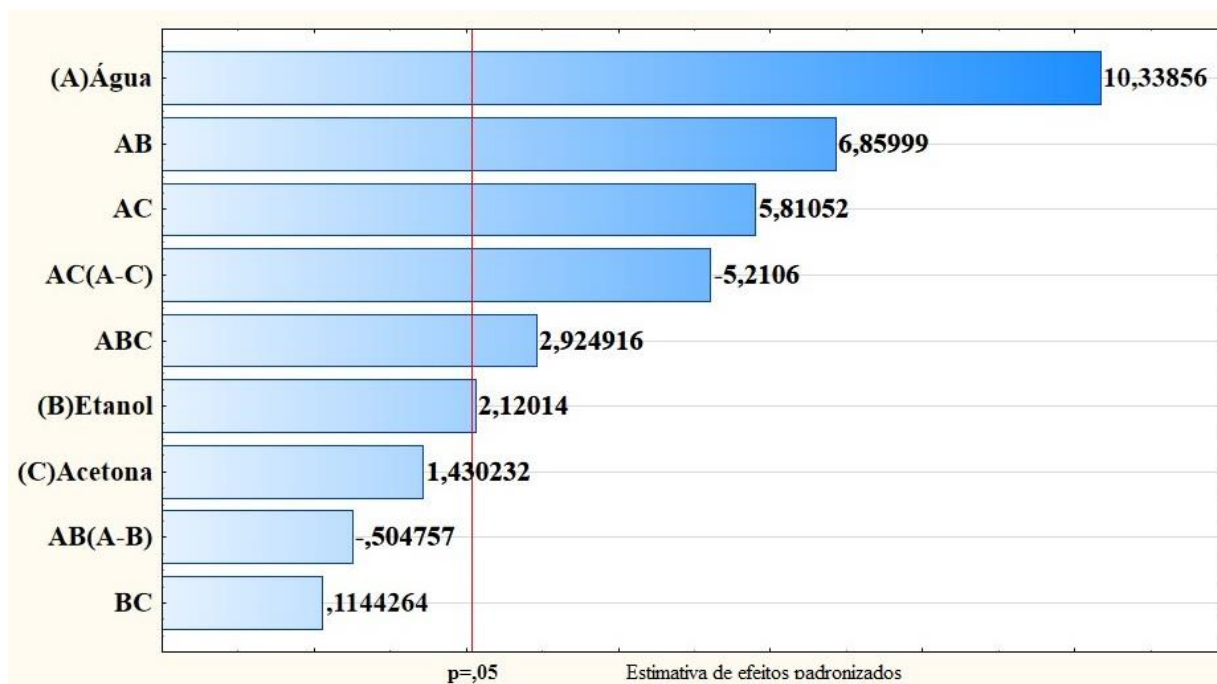
Desta forma verificou-se que para os três ciclos os extratos com maior capacidade antioxidante foi a proporção de água / acetona, seguida pela mistura de água / etanol, demonstrado nas regiões de colorações vermelhas mais intensas (FIGURA 4.4). Essa variação pode estar relacionada com a diferença de polaridade entre os solventes, pois substâncias de naturezas diferentes são extraídas conforme a polaridade do solvente. Brahmi et al (2012) afirma que variação na capacidade antioxidante entre os extratos pode ser devido a diversidade dos compostos extraídos com diferentes solventes.

O gráfico de Pareto (FIGURA 4.5) foi aplicado para investigar a contribuição relativa das variáveis independentes sobre a atividade antioxidante. O resultado mostrou que a água (A) foi o fator mais importante seguido por sua interação com etanol (AB) e acetona (AC), respectivamente. Misturas de solventes ternários (ABC), também foram significantes no nível



de confiança de 95%, enquanto acetona pura (C) e sua interação com etanol (BC) não foram significantes.

Figura 4.5 — Gráfico de pareto padronizado ( $p < 0,05$ ) representando os efeitos estimados de parâmetros e interações de parâmetros na atividade antioxidante.



Fonte: Do autor, 2019.

As médias do conteúdo de fenóis totais ( $\text{mg EAG.g}^{-1}$  de folha seca) e da capacidade antioxidante total ( $\text{mg EAA.g}^{-1}$  de folha seca) em relação aos efeitos dos diferentes solventes e do tempo de extração estão demonstrados na Tabela 4.1. Observa-se que para extração dos fenóis a proporção dos solventes mais eficientes foi água e etanol (1/2:1/2) no terceiro ciclo, com média de  $187 \text{ mg EAG.g}^{-1}$  de folha seca e uma eficiência extrativa maior que 95%. A mistura de água, etanol e acetona (2/2:1/6:1/6) seguido de água e acetona (1/2:1/2), também mostraram elevadas quantidades de fenóis nos extratos. Já as menores médias foram verificadas na mistura de etanol e acetona (1/2:1/2) com média de  $19 \text{ mg EAG.g}^{-1}$  e em etanol e acetona puros com médias de 14 e  $24 \text{ mg EAG.g}^{-1}$ . Ballesteros, Teixeira e Mussato (2014) afirmam que o metanol, etanol, acetona e água são os solventes mais comuns utilizados para a extração de fenólicos compostos de diferentes matérias-primas. E dependendo das combinações obtidas desses solventes e da espécie vegetal, o teor de constituintes extraídos pode variar.

Tabela 4.1 — Proporções dos solventes utilizados durante os ciclos e médias dos valores extraídos de fenóis totais e da capacidade antioxidante total.

| Operação | Água | Etanol | Acetona | Ciclo x tempo (min) | Fenóis Totais (mg EAG g <sup>-1</sup> folha seca) | CAT (mg EAA . g <sup>-1</sup> folha seca) |
|----------|------|--------|---------|---------------------|---|---|
| 1        | 1    | 0      | 0       | 1x15                | 54,97 ± 0,54                                      | 62,95 ± 5,35                              |
| 2        | 0    | 1      | 0       | 1x15                | 6,53 ± 0,37                                       | 9,65 ± 5,60                               |
| 3        | 0    | 0      | 1       | 1x15                | 9,92 ± 0,11                                       | 3,64 ± 0,59                               |
| 4        | 1/2  | 0      | 1/2     | 1x15                | 120,20 ± 5,36                                     | 73,76 ± 4,50                              |
| 5        | 1/2  | 1/2    | 0       | 1x15                | 130,05 ± 3,92                                     | 83,86 ± 6,88                              |
| 6        | 0    | 1/2    | 1/2     | 1x15                | 5,64 ± 1,19                                       | 6,47 ± 2,02                               |
| 7        | 1/3  | 1/3    | 1/3     | 1x15                | 112,42 ± 4,17                                     | 79,53 ± 8,91                              |
| 8        | 1/6  | 1/6    | 2/3     | 1x15                | 75,15 ± 0,33                                      | 96,22 ± 9,07                              |
| 9        | 1/6  | 2/3    | 1/6     | 1x15                | 62,57 ± 0,31                                      | 66,67 ± 18,43                             |
| 10       | 2/3  | 1/6    | 1/6     | 1x15                | 120,04 ± 4,60                                     | 71,60 ± 8,54                              |
| 11       | 1    | 0      | 0       | 2x15                | 76,57 ± 0,34                                      | 74,95 ± 5,87                              |
| 12       | 0    | 1      | 0       | 2x15                | 11,68 ± 0,68                                      | 13,93 ± 5,61                              |
| 13       | 0    | 0      | 1       | 2x15                | 22,93 ± 0,09                                      | 8,81 ± 1,16                               |
| 14       | 1/2  | 0      | 1/2     | 2x15                | 156,51 ± 3,98                                     | 92,94 ± 4,78                              |
| 15       | 1/2  | 1/2    | 0       | 2x15                | 172,91 ± 3,43                                     | 105,05 ± 7,13                             |
| 16       | 0    | 1/2    | 1/2     | 2x15                | 11,42 ± 1,23                                      | 10,60 ± 1,98                              |
| 17       | 1/3  | 1/3    | 1/3     | 2x15                | 151,22 ± 6,09                                     | 95,65 ± 8,57                              |
| 18       | 1/6  | 1/6    | 2/3     | 2x15                | 107,47 ± 1,72                                     | 112,2 ± 10,41                             |
| 19       | 1/6  | 2/3    | 1/6     | 2x15                | 102,61 ± 0,47                                     | 86,32 ± 17,79                             |
| 20       | 2/3  | 1/6    | 1/6     | 2x15                | 164,13 ± 1,87                                     | 92,32 ± 9,94                              |
| 21       | 1    | 0      | 0       | 3x15                | 84,70 ± 0,41                                      | 80,81 ± 6,13                              |
| 22       | 0    | 1      | 0       | 3x15                | 14,35 ± 0,86                                      | 16,32 ± 5,43                              |
| 23       | 0    | 0      | 1       | 3x15                | 24,23 ± 0,10                                      | 10,40 ± 1,17                              |
| 24       | 1/2  | 0      | 1/2     | 3x15                | 167,69 ± 3,82                                     | 98,85 ± 4,84                              |
| 25       | 1/2  | 1/2    | 0       | 3x15                | 187,42 ± 3,05                                     | 111,72 ± 7,64                             |
| 26       | 0    | 1/2    | 1/2     | 3x15                | 19,96 ± 1,53                                      | 15,88 ± 2,41                              |
| 27       | 1/3  | 1/3    | 1/3     | 3x15                | 165,49 ± 5,80                                     | 103,67 ± 8,56                             |
| 28       | 1/6  | 1/6    | 2/3     | 3x15                | 120,30 ± 2,27                                     | 119,07 ± 9,87                             |
| 29       | 1/6  | 2/3    | 1/6     | 3x15                | 123,20 ± 1,14                                     | 98,26 ± 18,25                             |
| 30       | 2/3  | 1/6    | 1/6     | 3x15                | 177,04 ± 2,22                                     | 99,37 ± 10,83                             |

Fonte: Do autor, 2019.

Os autores Dent et al. (2013) confirmaram que o sistema de combinação binária entre os solventes água, etanol e acetona apresentaram maior eficiência para extração de constituintes fenólicos em *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) quando comparado o uso individual dos mesmo.

Para capacidade antioxidante total nota-se que o solvente contendo água, etanol e acetona (1/6:1/6:2/3) apresentou as maiores médias com 119 mg de EAA.g<sup>-1</sup> de folha secas, para o terceiro ciclo. A proporção de água e etanol (1/2:1/2) também demonstrou elevada atividade antioxidante (111,7 mg de EAA.g<sup>-1</sup>). Estes resultados podem ter ocorrido devido às diferentes substâncias extraídas conforme a polaridade de cada solvente (TABELA 4.1). Mohammedelnour et al. (2017) confirmaram, que a variação na capacidade antioxidante dos extratos ocorre devido à diferença de polaridade, imiscibilidade e a natureza dos compostos extraídos usando vários solventes. Degáspari, Waszczynskyj e Dos Santos (2004), extraíram diferentes metabólitos antioxidante conforme a polaridade dos solventes (água e etanol).

Outro ponto observado foi que mais de 95% dos constituintes tanto para os fenóis como para o CAT foram extraídos no terceiro ciclo (3x15). Ballesteros, Teixeira e Mussato (2014) corroboram com estes resultados, pois obtiveram melhor extração de substâncias fenólicas antioxidantes no período de aproximadamente 30 minutos utilizando como solvente uma solução hidroetanólica (60%). Nesse contexto e com base nos resultados, nota-se que o uso do solvente hidroetanólico (50%) por três ciclos de 15 minutos é o mais indicado para extração de substâncias fenólicas na espécie *M. officinalis* L., apresentando uma eficiência extrativa maior que 95%.

### **3.2 Extratos de folhas de *Melissa officinalis* L.**

Os teores das substâncias fenólicas e flavonoides estão apresentados na Tabela 4.2. Os tratamentos com a presença dos FMAs (CFSE e CFCE) se destacaram em relação aos demais, por apresentarem, respectivamente, as maiores médias significativas de fenóis totais (136 e 135 mg de EAG . g<sup>-1</sup> de folha seca) em relação aos sem inoculação de fungos.

Porém para os teores de flavonoides totais, a adubação orgânica não influenciou no acúmulo desse constituinte, pois os tratamentos SFCE e CFCE apresentaram as menores médias 0,68 e 0,66 mg de EQ . g<sup>-1</sup> de folha seca, respectivamente. Já as maiores médias foram observadas na ausência da adubação (SFSE e CFSE), com médias 0,84 e 0,95 mg de EQ . g<sup>-1</sup> de folha seca, respectivamente.

Tabela 4.2 — Conteúdo de fenóis totais e flavonoides do extrato hidroetanólico de folhas secas, de plantas de *M. officinalis* L. cultivadas sob a influência de FMAs e da adubação orgânica em casa de vegetação.

| Tratamentos | Fenóis Totais<br>(mg de EAG . g <sup>-1</sup> folha seca) |          | Flavonoides Totais<br>(mg de EQ . g <sup>-1</sup> folha seca) |        |
|-------------|---|----------|---|--------|
|             | SF  | CF       | SF  | CF     |
| SE          | 77,17aB   | 136,45aA | 0,84aA  | 0,95aA |
| CE          | 76,37aB   | 135,26bA | 0,68bA  | 0,66bA |
| CV%         | 1,8   |          | 5,0   |        |

**SE:** Sem esterco; **CE:** Com esterco; **SF:** Sem fungos; **CF:** Com fungos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade (p<0,05).

Fonte: Do autor, 2019.

Em relação a influência dos fungos micorrízicos nas substâncias fenólicas, verifica-se que as maiores médias significativas de fenóis foram nos tratamentos inoculados ( CFSE e CFCE), respectivamente com 136,45 e 135,26 mg de EAG . g<sup>-1</sup> de folha secas. Enquanto que, os tratamentos sem inoculação (SFSE e SFCE) apresentaram as menores médias, com 77,17 e 76,37 mg de EAG . g<sup>-1</sup> de folha seca. Thangavel et al. (2009), estudando a influência dos FMAs (*Acaulospora scrobiculata*, *Gigaspora margarita*, *Glomus aggregatum*, *G. geosporum*, *Funneliformis mosseae*, *Sclerocystis pakistanika* e *Scutellospora heterogama*) nos constituintes fitoquímicos da espécie *Pogostemon patchouli* Pellet (Lamiaceae), observou que as plantas com inoculação apresentaram maior conteúdo de fenóis totais, como: orto-di-hidroxi fenóis, flavonoides e taninos em relação ao controle. Jugran et al. (2015), observaram que a colonização de FMAs (*Glomus intradices* spp.) na espécie medicinal *Valeriana jatamansi* Jones proporcionou aumentos na produção de metabólitos secundários, dentre eles, substâncias fenólicas.

As médias das análises de atividade antioxidante estão apresentadas na Tabela 4.3. Verificou-se que para a capacidade antioxidante total (CAT) os tratamentos sem adubação (SFSE e CFSE) demonstraram maior atividade, com médias de 11,96 e 11,75 mg de EAA.g<sup>-1</sup> de folha seca, respectivamente. Este resultado já era esperado, pois anteriormente foi observado que os mesmos tratamentos apresentaram significativamente maior teor de flavonoides. Tusevski et al. (2014) observaram uma correlação linear positiva entre a atividade antioxidante e os fenóis totais, flavonóides e fenilpropanoides indicando que esses constituintes são provavelmente os principais antioxidantes que contribuem para as atividades observadas nas espécies *Melissa officinalis* L. e *Salvia rigens* Sibth. & Sm.

Tabela 4.3 — Médias dos valores da capacidade antioxidante total (CAT) e da atividade antioxidante pela captura do radical livre (DPPH) do extrato hidroetanólico (50%) de *M. officinalis* L. cultivada sob a influência de fungos micorrízicos e da adubação orgânica em casa de vegetação.

| Tratamentos | CAT<br>(mg de EAA.g <sup>-1</sup> de folha seca) |         | DPPH<br>(mg.mL <sup>-1</sup> ) |         |
|-------------|--|---------|--------------------------------|---------|
|             | SF   | CF      | SF                             | CF      |
| SE          | 11,96aA  | 11,75aA | 0,168bB                        | 0,118aA |
| CE          | 11,08bA  | 10,39bB | 0,136aA                        | 0,136bA |
| CV%         | 4,8  |         | 3,0                            |         |

**SE:** Sem esterco; **CE:** Com esterco; **SF:** Sem fungos; **CF:** Com fungos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor, 2019.

O autor Müzell (2006), afirma que dentre as atividades descritas para os constituintes fenólicos, os efeitos antioxidantes estão atribuídos a esse grupo de moléculas. Além disso, varias pesquisas como a de Skendi, Irakli e Chatzopoulou (2017), Radácsi et al. (2016), Nicolai et al. (2016), Skotti et al. (2014) e Srabovic et al. (2011) comprovaram efeitos antioxidantes para espécie *M. officinalis* L.

O tratamento sem adubação e com fungo CFSE apresentou resultados similares para o teste de DPPH, pois novamente demonstrou elevada atividade antioxidante. Nessa análise, o resultado foi expresso em IC<sub>50</sub>, que é a concentração necessária do antioxidante para reduzir em 50% o radical DPPH, sendo que quanto menor o IC<sub>50</sub>, maior o potencial antioxidante. Então, observa-se que o tratamento CFSE apresentou o menor valores de IC<sub>50</sub> (0,118 mg.mL<sup>-1</sup>), comprovando elevado potencial antioxidante, quando comparado com os demais tratamentos. Lameira e Pinto (2008), afirmam que o excesso ou a falta de nutriente pode proporcionar maior ou menor produção de metabólitos secundários.

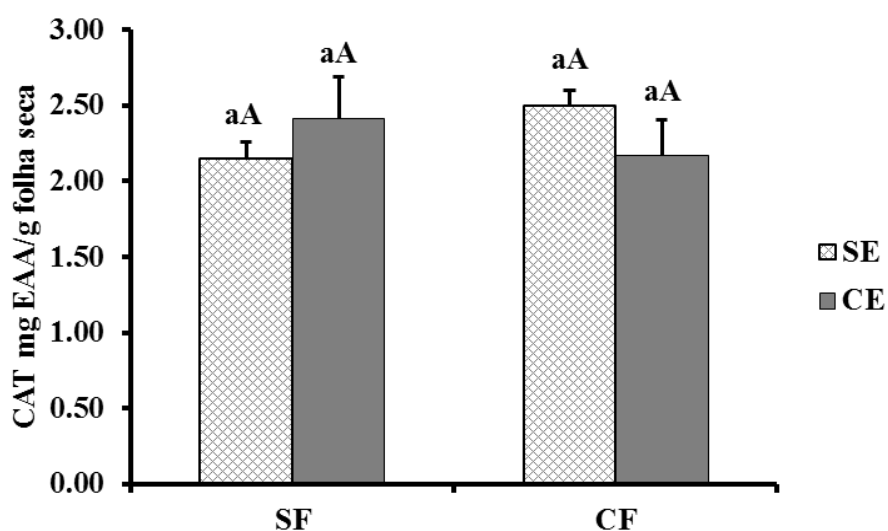
Além disso, esse maior potencial antioxidante do tratamento CFSE pode está relacionado com os elevados teores de fenóis totais (136,45 mg EAG . g folha seca<sup>-1</sup>) e flavonoides (0,95 mg EQ . g de folha seca<sup>-1</sup>) apresentados anteriormente na Tabela 4.2, bem como a alta capacidade antioxidante total (11,75 mg EAA . g de folha seca<sup>-1</sup>). Neste caso, isso indica que a ausência da adubação orgânica e a presença dos fungos ocasionaram a defesa antioxidante. Toussaint et al. (2007), também observaram que a colonização com FMAs (*Rhizophagus irregularis* (sny. *Glomus intraradices*), *Glomus caledonium* e *Funneliformis mosseae*) aumentou a atividade antioxidante da espécie *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae).

### 3.3 Óleo essencial *Melissa officinalis* L.

Na Figura 4.7 estão apresentadas as médias da capacidade antioxidante total do óleo essencial da espécie erva-cidreira. Observa-se que não houve diferenças significativas entre as variáveis estudadas Apêndice C, mas a maior média obtida foi no tratamento CFSE com 2,5 mg EAA.g<sup>-1</sup> de folha seca.

Conforme relatos da literatura, a colonização com FMAs pode aumentar a atividade antioxidante dos vegetais em comparação com os não inoculados. Fato este já comprovado por Zayova et al. (2018), onde os autores confirmaram que a espécie *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) apresentou maior capacidade antioxidante quando inoculada com fungos micorrízicos. Hristozkova et al. (2017) também obtiveram resultados similares para espécie *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Os autores Engel et al. (2015) estudando a mesma espécie observaram que o estabelecimento dos fungos micorrízicos promoveu maior acúmulo de constituintes fenólicos em relação ao controle.

Figura 4.7 — Médias dos valores da capacidade antioxidante total (CAT) do óleo essencial de *M. officinalis* L. cultivada sob a influência de fungo micorrízicos e da adubação orgânica em casa de vegetação.

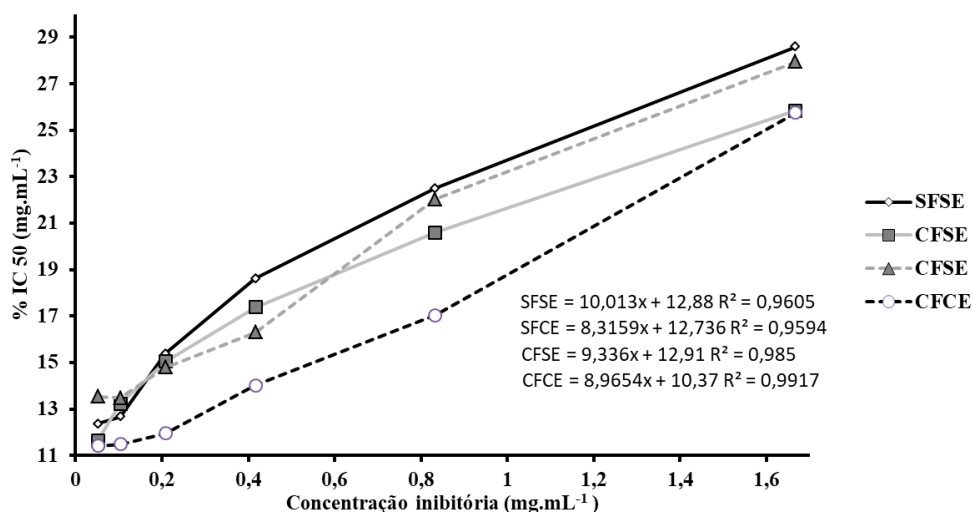


**SE:** Sem esterco; **CE:** Com esterco; **SF:** Sem fungo; **CF:** Com fungo. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, para o fator esterco e maiúsculas para fator fungo não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor, 2019.

A porcentagem de inibição para a atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH estão demonstrados na Figura 4.8. Verifica-se que as concentrações utilizadas não apresentaram redução em 50% do radical. Porém observa-se que os tratamentos (SFSE e CFSE) obtiveram as maiores taxas de inibição com 28,6 e 27,9 % respectivamente, ou seja, apresentaram maior potencial antioxidante. Essa baixa inibição pode ser pelas baixas concentrações de óleo essencial utilizadas durante as análises, já que as quantidades obtidas durante a extração foram poucas.

Figura 4.8 — Médias dos valores da porcentagem de inibição pela captura do radical livre (DPPH) do óleo essencial de *M. officinalis* L. cultivada sob a influência de fungos micorrízicos e da adubação orgânica em casa de vegetação.



SE: Sem esterco; CE: Com esterco; SF: Sem fungo; CF: Com fungo.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa mostram que a espécie *Melissa officinalis* L. sofre influência tanto dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e da adubação orgânica no acúmulo de constituintes fenólicos. Sendo que a colonização com FMAs proporciona principalmente o acúmulo de fenóis totais e a ausência da adubação orgânica condiciona maior capacidade antioxidante total (CAT).

Portanto, a erva-cidreira demonstrou sensibilidade aos fatores de adubação e fungos, apresentando defesa antioxidante conforme os testes empregados, sendo que tanto os extratos quanto o óleo essencial conferiram atividade antioxidante.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo buscou observar as principais influências dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e da adubação orgânica no cultivo de *Melissa officinalis* L., tanto em relação ao crescimento da espécie, como também na produção de óleo essencial e do potencial antioxidante da mesma.

Durante os estudos verificou-se que a adubação orgânica foi de grande importância para o cultivo desta espécie, pois os tratamentos adubados apresentaram as maiores médias para a matéria seca das: folhas, raiz, parte aérea, total e razão raiz/parte aérea. Além disso, a presença desse fator proporcionou maior produção de óleo essencial em termos de teor (%) e rendimento por planta.

Os FMAs são reconhecidos por formar simbiose com vegetais, colonizando as raízes e proporcionando uma maior exploração do solo pela absorção de água e nutrientes (principalmente os de baixa mobilidade).

Nesta pesquisa, os FMAs na ausência da adubação orgânica condicionaram um melhor desempenho das plantas quando comparadas ao controle (sem fungos / sem adubação), acrescentando ganhos significativos em matéria seca, na folha foi de 94%; caule 74%; parte aérea 87%; raiz 19% e total de 91%.

Em relação à produção de óleo essencial, os FMAs não ocasionaram influências significativas, porém no que diz respeito ao composto majoritário, o citral (neral+geranial), a presença dos fungos aliada à adubação orgânica garantiu o maior acúmulo desse constituinte.

Outro ponto importante observado foi que a colonização com FMAs, tanto na presença como na ausência da adubação orgânica, conferiram maior acúmulo de fenóis totais nas plantas.

Esta pesquisa almejou ampliar os conhecimentos da relação simbiótica entre fungo-planta, buscando inovações para melhorar a produção de plantas medicinais, pois sabe-se que a área de estudos envolvendo a colonização de FMAs e esse tipo de espécies ainda está em



progresso, já que pouco se conhece sobre a preferencialidade dos FMAs com determinadas espécies medicinais. Essa iniciativa abre as portas para futuras pesquisas que envolvam diferentes espécies de FMAs, bem como, de plantas medicinais.

## REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 772-781, 2014.
- AZEEZ, J. O.; VAN AVERBEKE, W. Nitrogen mineralization potential of three animal manures applied on a sandy clay loam soil. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5645-5651, 2010.
- BALLESTEROS, L. F; TEIXEIRA, J. A; MUSSATTO, S. I. Selection of the solvent and extraction conditions for maximum recovery of antioxidant phenolic compounds from coffee silverskin. **Food and bioprocess technology**, v. 7, n. 5, p. 1322-1332, 2014.
- BARCHAN, A. et al. The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 3, n. 11, p. 399-412, 2014.
- BRAHMI F. et al. Optimisation of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from Algerian mint (*Mentha spicata* L.). **Farmacognosy communications**, v. 2, 4, p. 72-86, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M-E; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRANT, R. S. **Características anatômicas, fisiológicas e de óleos essenciais de *Melissa officinalis* L.(Lamiaceae), em função da adubação orgânica, intensidade e qualidade de luz**. 2008. 138 p. Tese (Doutorado em Plantas Mediciniais Aromáticas e Condimentares). Universidade Federal de Lavras-MG. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normas climatológicas de 1961-1990**. Brasília, 992. 84 p. 1992.
- DEGÁSPARI, C. H; WASZCZYNSKYJ, N; DOS SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). **Visão acadêmica**, v. 5, n. 2, 2004.
- DENT, M. et al. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. **Food technology and biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 84, 2013.
- EBADOLLAHI, A.; ASHRAFI PARCHIN, R.; FARJAMINEZHAD, M. Phytochemistry, toxicity and feeding inhibitory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil against a cosmopolitan insect pest; *Tribolium castaneum* Herbst. **Toxin Reviews**, v. 35, n. 3-4, p. 77-82, 2016.
- ENGEL, Rita et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and polyphenol profile of marjoram, lemon balm, and marigold. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 19, p. 3733-3742, 2016.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

GUPTA, R; SAIKIA, S. K; PANDEY, R. Bioconsortia Augments Antioxidant and Yield in *Matricaria recutita* L. Against *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood Infestation. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 87, n. 2, p. 335-342, 2017.

HOFFMANN, L. V; LUCENA, V. S. Para entender Micorrizas Arbusculares. **Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

HRISTOZKOVA, M. et al. Mycorrhizal fungi and microalgae modulate antioxidant capacity of basil plants. **Journal of Plant Protection Research**, v. 57, n. 4, 2017.

JUGRAN, A. K. et al. The effect of inoculation with mycorrhiza: Am on growth, phenolics, tannins, phenolic composition and antioxidant activity in valeriana *jatamansi* jones. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 1036-1049, 2015.

KHODDAMI, A; WILKES, M; ROBERTS, T. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 2013.

LAMEIRA, O. A; PINTO, J. E B. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Embrapa Amazônia Oriental, 1ª Ed. Belém-Pa, 34, p. 2008.

LIMA, B. V et al. A adubação orgânica e a sua relação com a agricultura e o meio ambiente. **V Encontro científico e simpósio de educação unisalesiano**. A pesquisa frente a inovação e ao desenvolvimento sustentável. Unisalesiano, SP, outubro, 2015.

LIMA, C. S. et al. Mycorrhizal symbiosis increase the level of total foliar phenols and tannins in *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett seedlings. **Industrial Crops and Products**, v. 104, p. 28-32, 2017.

MOHAMMEDELNOUR, A. A. et al. Effect of solvent types on phenolics content and antioxidant activities of *Acacia polyacantha* gum. **International Food Research Journal**, v. 24, n. Suppl., 2017.

MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. **Technometrics**, v. 48, n. 1, p. 158–158, 2006.

MÜZELL, D. P. **Propriedades biológicas de extratos de *Melissa officinalis* L.(lamiaceae) em ratos wistar**. 2006. 70 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

NICOLAI, M. et al. Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. **Measurement**, v. 89, p. 328-332, 2016.

OLIVEIRA, M. S.; CAMPOS, M. A.; SILVA, F. S. Arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost to maximize the production of foliar biomolecules in *Passiflora alata* Curtis seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 3, p. 522-528, 2014.

PRIETO, P; PINEDA, M; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

- PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Universidade Federal de Lavras, UFLA. Fundação de Apoio ao Estudo Ensino e Extensão, FAEPE. MG- Lavras. 2002.
- RADÁCSI, P. et al. Effect of water deficit on yield and quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Zemdirbyste-Agriculture**, v. 103, n. 4, 2016.
- SÁ, P. G. S. de et al. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.
- SAFAEIAN, L. et al. Protective effect of *Melissa officinalis* extract against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human vascular endothelial cells. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 5, p. 383-389, 2016.
- SAMPAIO, C. R. P. et al. Anthocyanins and phenolic compounds in five ripening stages of *Byrsonima ligustrifolia* after extraction optimization. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 54, n. 4, p. 365–378, 2015.
- SANTOS FELIX, A. C. et al. Mixture design and doehlert matrix for the optimization of the extraction of phenolic compounds from *Spondias mombin* L apple bagasse agroindustrial residues. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, p. 1–8, 2018.
- SERTKAYA, E. Fumigant toxicity of the essential oils from medicinal plants against bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 553-555, 2013.
- SKENDI, A; IRAKLI, M; CHATZOPOULOU, P. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 6, p. 62-69, 2017.
- SKOTTI, E. et al. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 46-54, 2014.
- 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.
- SLINKARD, K; VERNON L. SINGLETO, V. L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.
- SRABOVIC, M. et al. Antioxidant capacity in some medicinal plants and fruits extracts. **HEALTHMED**, v. 5, n. 6, p. 2252-2257, 2011.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª Ed. Artmed Edit, p. 700, 2017.
- TOUSSAINT, J. P.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 4, p. 291-297, 2007.

TUSEVSKI, O. et al. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. **Central European Journal of Biology**, v. 9, n. 9, p. 888-900, 2014.

THANGAVEL, S. et al. Effect of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi on some growth parameters and phytochemical constituents of Pogostemon patchouli Pellet. **Maejo International Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 222-234, 2009.

WOISKY R. G., SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 1, p. 99-105, 1998.

ZAYOVA, E. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance antioxidant capacity of in vitro propagated garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Symbiosis**, v. 74, n. 3, p. 177-187, 2018.

## APÊNDICE A

Tabela ANOVA Densidade de esporos de FMAs

| FV              | GL    | SQ           | QM                     | Fc     | Pr>Fc  |
|-----------------|-------|--------------|------------------------|--------|--------|
| Esterco         | 1     | 18513,612500 | 18513,612500           | 13,327 | 0,0022 |
| Fungo           | 1     | 485,112500   | 485,112500             | 0,349  | 0,5628 |
| Esterco*Fungo   | 1     | 623,812500   | 623,812500             | 0,456  | 0,5094 |
| Erro            | 16    | 22227,200000 | 1389,200000            |        |        |
| Total corrigido | 19    | 41858,737500 |                        |        |        |
| CV%             | 57,59 |              |                        |        |        |
| Média geral     | 64,72 |              | Número de observações: |        | 20     |

## Colonização micorrízica %

| FV              | GL    | SQ          | QM                     | Fc     | Pr>Fc  |
|-----------------|-------|-------------|------------------------|--------|--------|
| Esterco         | 1     | 18,069005   | 18,069005              | 0,203  | 0,6581 |
| Fungo           | 1     | 1717,360445 | 1717,360445            | 19,321 | 0,0005 |
| Esterco*Fungo   | 1     | 103,376045  | 103,376045             | 1,163  | 0,2968 |
| Erro            | 16    | 1422,163400 | 88,885213              |        |        |
| Total corrigido | 19    | 3260,968895 |                        |        |        |
| CV%             | 26,45 |             |                        |        |        |
| Média geral     | 35,64 |             | Número de observações: |        | 20     |

## APÊNDICE B

Tabela ANOVA Resultados da análise de variância (ANOVA) para os modelos de mistura.

| Fonte de variação          | Somas dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Valor F calculado | Probabilidade |
|----------------------------|---------------------|--------------------|----------------|-------------------|---------------|
| <b>Fenóis Totais 1x15'</b> |                     |                    |                |                   |               |
| Modelo                     | 67169,29            | 5                  | 13433,86       | 582,4763          | 0,000000      |
| Erro total                 | 553,52              | 24                 | 23,06          |                   |               |
| Falta de ajuste            | 384,15              | 4                  | 96,04          | 11,3405           | 0,000057      |
| Erro puro                  | 169,37              | 20                 | 8,47           |                   |               |
| Total ajustado             | 67722,81            | 29                 | 2335,27        |                   |               |
| <b>Fenóis Totais 2x15'</b> |                     |                    |                |                   |               |
| Modelo                     | 111292,7            | 5                  | 22258,53       | 517,3680          | 0,000000      |
| Erro total                 | 1032,5              | 24                 | 43,02          |                   |               |
| Falta de ajuste            | 885,7               | 4                  | 221,43         | 30,1615           | 0,000000      |
| Erro puro                  | 146,8               | 20                 | 7,34           |                   |               |
| Total ajustado             | 112325,2            | 29                 | 3873,28        |                   |               |
| <b>Fenóis Totais 3x15'</b> |                     |                    |                |                   |               |
| Modelo                     | 125568,7            | 5                  | 25113,74       | 337,7260          | 0,000000      |
| Erro total                 | 1784,7              | 24                 | 74,36          |                   |               |
| Falta de ajuste            | 1640,2              | 4                  | 410,04         | 56,7543           | 0,000000      |
| Erro puro                  | 144,5               | 20                 | 7,22           |                   |               |
| Total ajustado             | 127353,4            | 29                 | 4391,50        |                   |               |
| <b>CAT 1x15'</b>           |                     |                    |                |                   |               |
| Modelo                     | 31812,57            | 8                  | 3976,571       | 31,85211          | 0,000000      |
| Erro total                 | 2621,74             | 21                 | 124,845        |                   |               |
| Falta de ajuste            | 1209,12             | 1                  | 1209,120       | 17,11881          | 0,000510      |
| Erro puro                  | 1412,62             | 20                 | 70,631         |                   |               |
| Total ajustado             | 34434,31            | 29                 | 1187,390       |                   |               |
| <b>CAT 2x15'</b>           |                     |                    |                |                   |               |
| Modelo                     | 44177,21            | 8                  | 5522,152       | 33,23202          | 0,000000      |
| Erro total                 | 3489,56             | 21                 | 166,170        |                   |               |
| Falta de ajuste            | 2005,41             | 1                  | 2005,408       | 27,02425          | 0,000044      |
| Erro puro                  | 1484,15             | 20                 | 74,208         |                   |               |
| Total ajustado             | 47666,78            | 29                 | 1643,682       |                   |               |
| <b>CAT 3x15'</b>           |                     |                    |                |                   |               |
| Modelo                     | 48443,70            | 8                  | 6055,463       | 31,89791          | 0,000000      |
| Erro total                 | 3986,62             | 21                 | 189,839        |                   |               |
| Falta de ajuste            | 2432,39             | 1                  | 2432,394       | 31,30047          | 0,000018      |
| Erro puro                  | 1554,22             | 20                 | 77,711         |                   |               |
| Total ajustado             | 52430,32            | 29                 | 1807,942       |                   |               |

## APÊNDICE C

Tabela ANOVA da Capacidade antioxidante total do óleo essencial de *Melissa officinalis* L.

| FV              | GL   | SQ       | QM                     | Fc    | Pr>Fc  |
|-----------------|------|----------|------------------------|-------|--------|
| Esterco         | 1    | 0,003333 | 0,003333               | 0,071 | 0,7964 |
| Fungo           | 1    | 0,008522 | 0,008533               | 0,182 | 0,6807 |
| Esterco*Fungo   | 1    | 0,252300 | 0,252300               | 5,388 | 0,0488 |
| Erro            | 8    | 0,374600 | 0,046825               |       |        |
| Total corrigido | 11   | 0,638767 |                        |       |        |
| CV%             | 9,39 |          |                        |       |        |
| Média geral     | 2,31 |          | Número de observações: |       | 12     |