

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA

SINARA MIRANDA LIMA

**PRODUÇÃO DE MUDAS E TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.)
N.E.Br ex Britton & P. Wilson SOB INOCULAÇÃO COM *Trichoderma asperellum***

CRUZ DAS ALMAS

2022

SINARA MIRANDA LIMA

**PRODUÇÃO DE MUDAS E TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.)
N.E.Br ex Britton & P. Wilson SOB INOCULAÇÃO COM *Trichoderma asperellum***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
como parte das exigências do curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas.

CRUZ DAS ALMAS

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA

Sinara Miranda Lima

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE
CURSO**

Monografia aprovada em: 09/12/2022



Prof. Dr.ª. Franceli da Silva
(Orientadora)



Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Barbosa
(Membro)



Prof. Dr.ª. Viviane Modesto Arruda
(Membro)

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Colegiado de Graduação em Bacharelado em Biologia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Á Deus.

Á meus pais, meus avós e à minha irmã.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças e nunca ter me desamparado ao longo de todo este caminho e por ter me proporcionado chegar até aqui.

Aos meus pais, Francisco e Simone, e a minha irmã, Gabriela, por serem o meu alicerce, por todo o apoio e amor incondicional, vocês são o meu exemplo de vida, sem vocês eu não teria chegado tão longe.

Aos meus avós maternos e paternos Maria e Rosalvo (*in memoriam*) e Francisco e Lucidalva, por todo o cuidado, carinho, conselhos e muito amor, vocês são o meu exemplo de cumplicidade e sabedoria.

A minha tia do coração, Milena, por ter me guiado até a UFRB, pela disponibilidade em me acompanhar durante a jornada desse ingresso e por todo apoio, lhe serei eternamente grata.

A minha prima Vanessa Ferreira, por ter me acolhido, me aconselhado, me apresentado ao mundo das medicinais e dos microrganismos, pelo qual me apaixonei, por todos os ensinamentos e puxões de orelha, aprendi muito com você.

A Bianca, a colega de casa que se tornou uma irmã, por estar comigo nos melhores e piores momentos, pelos conselhos, risadas e por toda a parceria.

Aos meus amigos Ana Paula, Jucimara, Iuri, Grazielle por compartilharem dos momentos felizes e os surtos de cada dia, tornando esse caminho mais leve, divertido e cheio de aprendizado.

A Eliseu por toda a ajuda, nas coletas de experimento e por sua amizade.

A meu amigo Marcelino, que apesar da distância, sempre esteve solícito a me ajudar, pelas conversas, conselhos e por sua amizade, levarei para a vida.

Aos meus colegas de laboratório, que se tornaram amigos, Gilvanda e Luiz, vocês foram de extrema importância para que chegasse até aqui. A Gilvanda por todos os ensinamentos, por me ajudar nas árduas coletas do experimento, por sofrer junto comigo a cada análise, pelas resenhas, risadas e pelas boas influências gastronômicas, rs. E a Luiz, por toda ajuda no campo, na coleta das plantas, no laboratório, pelas risadas, pelos perrengues e por sua amizade, serei grata.

As técnicas Lene e Veronica do laboratório de Microbiologia e Candice do prédio da Fitotecnia, por todo auxílio, atendendo aos meus pedidos.

Aos servidores do Bloco L, em especial, a “tia Lícia”, pelas conversas e pelo carinho.

Ao GEPLAM e todos aqueles que fizeram parte desse grupo, pela acolhida, por todo o aprendizado e todo conhecimento compartilhado, minha eterna gratidão.

A UFRB, CNPq, pelo apoio financeiro aos projetos aos quais eu fazia parte e pela concessão de bolsas e auxílio durante a graduação.

A minha orientadora, Franceli da Silva, por todos os conhecimentos compartilhados, todo auxílio, conversas, conselhos e puxões de orelha, sempre buscando o melhor de mim. E o exemplo de profissional no qual irei me espelhar, gratidão por todo o carinho e cuidado.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, minha mais sincera *Gratidão!*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1:** Imagem ilustrativa representando as mudas de cada tratamento com 15 e 30 dias após a aplicação da suspensão de esporos de *Trichoderma*.....**32**
- Gráfico 1-** Altura e comprimento de raiz de mudas de *Lippia alba* com 15 e 30 dias após inoculação com *Trichoderma*.....**29**
- Gráfico 2-** Número de hastes e folhas de mudas de *Lippia alba* com 15 e 30 dias após a inoculação com *Trichoderma*.....**30**
- Gráfico 3-** Diâmetro do caule de mudas de *Lippia alba* com 15 e 30 dias após a inoculação com o *Trichoderma*.....**30**
- Gráfico 4-** Massa seca e Fresca da parte aérea e da raiz de mudas de *Lippia alba* com 15 e 30 dias após a inoculação com *Trichoderma*.....**31**
- Gráfico 5-** Teor de óleo essencial de mudas de *Lippia alba* com diferentes tratamentos com 15 e 30 dias após a inoculação de *Trichoderma*.....**32**

CAPÍTULO 2

- Figura 1:** Altura (a), Número de hastes (b), Número de folhas (c), Número de folhas (d) de *Lippia alba*, cultivadas com e sem *Trichoderma* nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias.....**44**
- Figura 2:** Massa fresca das folhas (a), Massa fresca das flores (b), Massa fresca da raiz (c), Massa seca das folhas (d) de *Lippia alba*, cultivadas com e sem *Trichoderma* nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias.....**45**
- Figura 3:** Massa seca das folhas (a), Massa seca da raiz (b), Diâmetro médio das hastes (c), Comprimento de raiz (d) de *Lippia alba*, cultivadas com e sem *Trichoderma* nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias.....**46**
- Figura 4:** Fenólicos totais (a), Flavonoides totais (b) e teor de óleo essencial (c) de *Lippia alba*, cultivadas com e sem *Trichoderma* nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias.....**47**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Massa fresca da parte aérea, Massa seca da parte aérea e da raiz de mudas de *Lippia alba* submetidas aos tratamentos controle, *Trichoderma* com hidrogel, *Trichoderma* s/ hidrogel e Hidrogel, com 15 dias após a inoculação.....**33**

Tabela 2: Altura, Massa fresca de raiz, Comprimento de raiz e número de hastes de mudas de *Lippia alba* submetidas aos tratamentos controle, *Trichoderma* com hidrogel, *Trichoderma* s/ hidrogel e Hidrogel, com 30 dias após a inoculação.....**34**

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Variáveis Altura (ALT), Diâmetro das hastes (DH), Número de hastes (NH), Número de folhas (NF), Número de inflorescência (NI), Comprimento da raiz (CP), Massa fresca das folhas (MFF), Massa fresca da raiz (MFR), Massa fresca da inflorescência (MFI), Massa seca da raiz (MSR), Massa seca da inflorescência (MSI), Massa seca das folhas (MFF), Fenólicos totais (FEN), Flavonoides totais (FLAV) e TEOR de óleo essencial de *Lippia alba* analisadas em diferentes tempos de coleta, com e sem aplicação de *Trichoderma*.....**43**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO.....	9
REFERENCIAL TEÓRICO	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 1	23
PRODUÇÃO DE MUDAS E TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia alba</i> (MILL.) N.E.Br ex Britton & P. Wilson EM DIFERENTES SUBSTRATOS COM INOCULAÇÃO DE <i>Trichoderma</i>	23
1. Introdução.....	26
2. Materiais e Métodos	27
3. Resultados e Discussão.....	29
4. Conclusão	35
5. Referências Bibliográficas	36
CAPÍTULO 2	38
BIOMASSA E METABÓLITOS ESPECIAIS DE <i>Lippia alba</i> (MILL.) N.E.Br ex Britton & P. Wilson ASSOCIADAS AO <i>Trichoderma</i>	38
1. Introdução.....	41
2. Materiais e Métodos	42
3. Resultados e Discussão.....	44
4. Conclusão	48
5. Referências bibliográficas.....	49

RESUMO

Produção de mudas e teor de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br ex Britton & P. Wilson sob inoculação com *Trichoderma asperellum*

LIMA, Sinara Miranda, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, dezembro de 2022.

Orientadora: Franceli da Silva.

Resumo: A *Lippia alba* é uma planta medicinal que possui importância econômica devido a produção de compostos bioativos, dentre os quais podemos citar, os óleos essenciais. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento da sua cadeia produtiva visando a qualidade das plantas e o aumento da produção desses metabólitos especiais. Desse modo, associar o *Trichoderma* a *Lippia alba* pode favorecer o seu crescimento e desenvolvimento, produzindo plantas de melhor qualidade e vigor. Logo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do *Trichoderma* e hidrogel na produção de mudas e no teor de óleo essencial de *Lippia alba* cultivadas em casa de vegetação e analisar a influência do *Trichoderma* em diferentes tempos após a inoculação, na produção de biomassa e metabólitos especiais dessas plantas. Os tratamentos influenciaram significativamente a massa fresca, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz das mudas de *Lippia* aos 15 dias e a altura, massa fresca de raiz, comprimento de raiz, número de hastes e teor de óleo essencial das mudas aos 30 dias. Os resultados indicam que separadamente o hidrogel e *Trichoderma* proporcionam um efeito positivo no incremento de fitomassa das mudas de *Lippia*, aos 15 dias. Aos 30 dias, o *Trichoderma* proporcionou os maiores valores de altura, comprimento de raiz, número de hastes e massa fresca da raiz. O teor de óleo essencial foi maior nas mudas do controle, se diferenciando dos demais tratamentos. Já no cultivo em campo, aos 30 dias, todas as variáveis se diferenciaram entre si, onde as plantas cultivadas com duas aplicações de *Trichoderma* apresentaram as maiores médias, com exceção da altura. Aos 45 dias, todas as variáveis analisadas apresentaram diferenças significativas, as plantas de *L. alba* que foram cultivadas com o microrganismo apresentaram médias superiores as plantas do controle, indicando que três aplicações da suspensão de *Trichoderma* já é o suficiente para aumentar o crescimento e o acúmulo de fitomassa dessas plantas. Com relação a produção de metabólitos especiais, só houve diferença significativa no teor de óleo essencial aos 45 dias, ou seja, com três aplicações de *Trichoderma*, o qual proporcionou o maior teor de óleo essencial. Já com os fenólicos totais, só houve diferença significativa aos 15 dias, onde o cultivo com *Trichoderma* proporcionou uma maior biossíntese de compostos fenólicos. Para os flavonoides totais o único período que não houve diferença entre as

plantas cultivadas com e sem *Trichoderma* foi aos 45 dias, sendo que o *Trichoderma* aumentou a concentração desse fitoquímico. Portanto, o *Trichoderma* na produção de plantas de *Lippia alba* favorece o acúmulo de biomassa e aumenta a produção de metabólitos especiais, principalmente o teor de óleo essencial, obtendo o seu maior rendimento aos 45 dias, sendo esse, o melhor período de colheita das plantas.

Palavras chave: medicinal, erva-cidreira, microrganismo

ABSTRACT

Seedling production and essential oil content of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br ex Britton & P. Wilson under inoculation with *Trichoderma asperellum*

LIMA, Sinara Miranda, Federal University of Recôncavo da Bahia, December 2022. Advisor: Franceli da Silva.

Summary: *Lippia alba* is a medicinal plant that has economic importance due to the production of bioactive compounds, among which we can mention essential oils. Therefore, it is necessary to develop its production chain, aiming at plant quality and increasing the production of these special metabolites. Thus, associating *Trichoderma* with *Lippia alba* can favor its growth and development, producing plants of better quality and vigor. Therefore, the objective of this work was to evaluate the influence of *Trichoderma* and hydrogel on the production of seedlings and essential oil content of *Lippia alba* grown in a greenhouse and to analyze the influence of *Trichoderma* at different times after inoculation, on the production of biomass and special metabolites of these plants. The treatments significantly influenced the fresh mass, dry mass of the aerial part and dry mass of the root of the *Lippia* seedlings at 15 days and the height, fresh root mass, root length, number of stems and essential oil content of the seedlings at 30 days. The results indicate that separately the hydrogel and *Trichoderma* provide a positive effect on the increment of phytomass of *Lippia* seedlings, at 15 days. At 30 days, *Trichoderma* provided the highest values for height, root length, number of stems and root fresh mass. The essential oil content was higher in the control seedlings, differing from the other treatments. In field cultivation, at 30 days, all variables differed from each other, where plants cultivated with two applications of *Trichoderma* presented the highest averages, with the exception of height. At 45 days, all analyzed variables showed significant differences, the *L. alba* plants that were cultivated with the microorganism showed higher averages than the control plants, indicating that three applications of *Trichoderma* suspension is enough to increase growth and growth. accumulation of phytomass of these plants. Regarding the production of special metabolites, there was only a significant difference in the essential oil content at 45 days, that is, with three applications of *Trichoderma*, which provided the highest essential oil content. As for the total phenolics, there was only a significant difference at 15 days, where the cultivation with *Trichoderma* provided a greater biosynthesis of phenolic compounds. For total flavonoids, the only period in which there was no difference between plants grown with and without *Trichoderma* was at 45 days, with *Trichoderma* increasing the concentration

of this phytochemical. Therefore, *Trichoderma* in the production of *Lippia alba* plants favors the accumulation of biomass and increases the production of special metabolites, mainly the essential oil content, obtaining its highest yield at 45 days, which is the best period for harvesting the plants. .

Keywords: medicinal, lemon balm, microorganism

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Plantas Medicinais Aspectos Gerais

As plantas medicinais têm motivado cada vez mais a investigação científica devido as suas diversas aplicações nas indústrias alimentícias, farmacológicas, agrícola, etc. O mercado das plantas medicinais movimentada aproximadamente 70 bilhões de reais a cada ano, sendo a indústria farmacêutica a responsável pela maior parte dessa contribuição (REBOCHO, 2015).

Dentro dos agroecossistemas, as plantas medicinais podem desempenhar diversas funções referentes ao manejo agrônômico baseados em princípios agroecológicos. Diversas espécies utilizadas na medicina tradicional estão sendo introduzidas nesses agroecossistemas, com diferentes propósitos (ASSOCIAÇÃO..., 2006; FETTER; MULLER, 2007; LIMA et al. 2007; BORSATO, FEIDEN 2011). Alguns deles são: como atrativas e repelentes de insetos, ajudando na polinização e controle natural; inibidoras ou estimuladoras do desenvolvimento de outras plantas (alelopatia), atuando como espécie antagonista ou companheira, as que em forma de extrato fazem parte da composição de herbicidas, fungicidas ou inseticidas e também em forma de composto orgânico, utilizadas como fertilizantes (BORSATO, FEIDEN, 2011).

O cultivo de plantas medicinais deve ser cuidadosamente realizado, para que elas se desenvolvam qualitativa e quantitativamente bem, sem que prejudiquem o meio ambiente, utilizando técnicas adequadas para preservação do solo e plantio, como a utilização de adubos verdes e a cobertura vegetal, que além de protegerem o solo da radiação solar, previnem a evaporação excessiva da água e melhoram as características físicas, químicas e biológicas do solo (GOMES et al., 2021; MOREIRA, 2016).

1.1 Metabólitos Especiais

As plantas possuem dois tipos de metabolismo, dividido em primário, que produz metabólitos essenciais ao desenvolvimento e sobrevivência do vegetal e o especial (secundário), cujos os princípios ativos resultante possuem funções ecológicas, garantindo a sobrevivência da planta em locais adversos (ROCKENBACH, 2018). As principais classes de princípios ativos são os terpenos, alcaloides, compostos fenólicos e glicosídeos, sendo que os terpenos agregam um grande número de compostos, uma

grande diversidade de moléculas que na maioria das vezes é insolúvel em água, devido a sua baixa densidade, como é o caso dos óleos essenciais, que possui grande interesse comercial (GARCIA, CARRIL, 2009).

Óleos essenciais são uma mistura de substâncias lipofílicas, possuem características odoríferas e estado líquido, sendo voláteis e solúveis em solventes orgânicos. São sintetizados por rotas metabólicas específicas, diferindo das rotas de produção de compostos primários como produção de proteínas e carboidratos. Para a ocorrência da síntese de compostos especiais, como o óleo essencial, é importante que haja uma relação entre as rotas primárias que fornecem precursores para as rotas especiais produzirem esses produtos (TAVARES et al., 2011).

Devido a sua fragrância e suas propriedades medicinais, os óleos essenciais são amplamente utilizados e dentre essas propriedades medicinais apresentam atividades antimicrobiana, antifúngica, acaricida, anti-inflamatória, antioxidante, anticonvulsivante, entre outras (SILVEIRA et al., 2018).

Outra classe que apresenta um grande potencial econômico, são os compostos fenólicos, que se caracterizam pela presença de pelo menos um anel fenólico tendo um ou mais grupos hidroxila ligados em sua estrutura, e desempenham diversas funções na sobrevivência da planta como, proteção contra a radiação UV, contra insetos e patógenos, dentre outros (ELGUEA-CULEBRAS et al., 2022).

Além disso, os fenóis possuem inúmeras atividades biológicas, principalmente como antioxidantes, anti-inflamatórios, antienvhecimento, citotóxicos e antitumorais, antidepressivos, reduzem os lipídios e a glicose no sangue em humanos, protegem os sistemas biológicos contra os efeitos nocivos da oxidação dos processos em macromoléculas, atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, atividade antidiabética e aumenta a secreção biliar (GHASEMZADEH e GHASEMZADEH, 2011, PANCHE et al., 2016).

Por isso, essas moléculas são de grande interesse para as áreas como a agricultura, agroindústria, cosméticos e fármacos (ELGUEA-CULEBRAS et al., 2022).

2. *Lippia alba* (Mill) N.E. Br. ex Britton & P.Wilson

A família Verbenaceae compreende cerca de 175 gêneros e 2800 espécies com ampla distribuição geográfica. As espécies pertencentes a essa família possuem uma

diversidade de hábitos que variam desde o herbáceo até o arbóreo, apresentando com maior frequência as espécies arbustivas e raramente as lianas (CARDOSO et al., 2020; ATKINS, 2004; MARX et al., 2010). Dentre os gêneros dessa família, temos a *Lippia*, que só no Brasil foram catalogadas oitenta e oito espécies, das quais, sessenta e oito são endêmicas (PERERA et al., 2017).

Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson, popularmente conhecida como erva cidreira, é um subarbusto aromático, amplamente distribuídos pelas Américas e encontrados em diferentes ambientes, como florestas, campos e margens de estradas (SALIMENA E MÚLGURA, 2015). É uma planta bastante ramificada, com aspecto esbranquiçado onde os seus ramos podem atingir 280 cm de comprimento dependendo das condições climáticas e nutricionais do solo. O diâmetro da copa pode variar entre 60-474 cm entre ramificações opostas (MARCHESE et al., 2010; CAMÊLO et al., 2011). As folhas possuem filotaxia oposta, com formas elípticas ou lanceoladas, bordas serradas e ausência de estipula na base do pecíolo (AGUIAR e COSTA, 2005; DE ROMERO et al., 2010)

É comumente utilizada na medicina popular sul-americana como analgésico, anti-inflamatório, remédio para resfriado, bem como tratamento para aflições hepáticas (OLIVEIRA et al., 2006). A *L. alba* possui diversas propriedades como cito toxicidade, antioxidante, antibiofilme, atividades anestésicas, antitumorais, antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antiespasmódicas e do tipo ansiolítico os efeitos diferem de acordo com o quimiotipo presentes no óleo essencial (GLAMOČLIJA et al., 2011; TREVISAN et al., 2016; TOFIÑORIVERA et al., 2016; PANDEY et al., 2016, GARCÍA et al., 2017).

Segundo MATOS (1996) cada quimiotipo diferente possui uma atividade biológica específica, por exemplo, o quimiotipo mirceno-citral está relacionado com o tranquilizante, analgésico e, atividades antiespasmódicas de forma semelhante, o quimiotipo limoneno-citral que mostrou também atividades ansiolíticas, sedativas e antiespasmódicas. Já, o limoneno-carvona está relacionado com ação mucolítica e para distúrbios gastrointestinais.

Os óleos essenciais das folhas de *L. alba* foram categorizados em diferentes quimiotipos, dependendo de seus principais constituintes, como linalol, citral e carvona (PANDELÓ et al., 2012). Estudos realizados por Peixoto (2019), por meio de uma triagem fitoquímica de *Lippia alba*, utilizando as suas folhas para preparação do extrato hidroalcoólico, foi detectada a presença de flavonoides e taninos, o que pode justificar a

atividade antimicrobiana relatada por outros autores, já que os compostos fenólicos possuem tal propriedade. Além destas citadas, foram identificados também a presença de cumarinas, alcaloides e esteroides (GOMES et al., 2016; PEIXOTO, 2019).

A composição e a atividade dos metabólitos especiais podem ser modificadas por vários aspectos, desde o modo de extração, a fatores próprios da planta e do ambiente em que ela está inserida, como o cultivo, horário de colheita da planta, ou seja, a sazonalidade, utilização de que parte da planta, dentre outros (SILVA et al., 2011).

2.1 Produção de Mudanças de *Lippia alba*

A variação da composição química das matrizes (TELES et al., 2014) e a falta de material vegetal para exploração, muitas vezes devido à dificuldade de propagação das plantas, são uns dos problemas que restringem o desenvolvimento de processos e produtos com os compostos ativos da *Lippia*. Assim, pesquisas voltadas à propagação, cultivo, composição, rendimento e atividade fitoquímica ou biológica são importantes (OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2019).

A propagação de plantas do gênero *Lippia* via sementes pode ser dificultada pelo tamanho e baixo poder germinativo das mesmas (BISPO et al., 2016), além disso, plantas reproduzidas sexualmente possuem muita variabilidade genética, e conseqüentemente variabilidade na síntese de compostos do metabolismo especial (BATISTA, BOTREL e FIGUEIREDO, 2015). Uma das alternativas viáveis de propagação é a estaquia. Nessa técnica, retira-se partes de caule da planta matriz, mantendo-se no mínimo duas gemas em cada pedaço, que sob condições favoráveis ocorre o desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, sendo que as plantas filhas vão possuir o mesmo material genético da planta mãe (OLIVEIRA et al., 2011).

Para a propagação de *L. alba* utilizam-se estacas lenhosas ou semilenhosas de 20 cm de comprimento com 4 a 5 nós sem folhas (BIASI e COSTA, 2003). Muitos fatores podem estimular a emissão de raízes das estacas, como o substrato (SILVA et al., 2015) e a utilização de microrganismos benéficos.

O processo de formação radicular é influenciado pelo substrato, que precisa fornecer água, oxigênio e nutrientes em quantidades adequadas (SOUZA et al., 2016). A incorporação de hidrogel aos substratos tem sido estudada nos últimos anos, pois permitem uma maior retenção de água e nutrientes, que podem ser liberados lentamente para as plantas devido aos ciclos de absorção-liberação, além de aumentarem a

porosidade, e conseqüentemente o espaço de aeração (NAVROSKI et al., 2016). Associado ao *Trichoderma* spp. pode ser uma estratégia para favorecer o crescimento de mudas de *L. alba* e um bom desenvolvimento em campo.

3. *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* têm cerca de 10.000 espécies, a maioria cresce rapidamente. No início, as cepas de *Trichoderma* pareciam brancas e algodoadas, em seguida, desenvolvem-se em tufo compacto verde-amarelado a verde profundo, especialmente no centro de uma mancha de crescimento ou em zonas semelhantes a anéis concêntricos na superfície do ágar (WAGHUNDE et al., 2016).

Os conidióforos são repetidamente ramificados, irregularmente arranjados em espirais, aparecem como grupos de fiálides divergentes, geralmente curvos assimétricos, em forma de frasco / cilíndrica a quase subglobosa. Os conídios elipsoidais globosos são geralmente verdes, às vezes hialinas para se agruparem em agregados no terminal das fiálides (ZHU E ZHUANG, 2015). Algumas espécies produzem um odor característico de doce ou "coco" devido a um volátil biologicamente ativo composto (6-pentil- α -pirona) (SAMUELS, 2006; FERON et al, 1996).

O gênero de *Trichoderma* é também reconhecido como fungo endofítico sendo encontrado nos tecidos foliares ou raízes, proporcionando uma série de vantagens ao seu hospedeiro (CUMMINGS et al., 2016). O processo de aderência à superfície da raiz pode ser mediado por pequenas proteínas hidrofóbicas da superfície externa da parede celular (hidrofobinas) e por proteínas do tipo expansina capazes de reconhecer a celulose e modificar a arquitetura da raiz da planta (MENDOZA-MENDOZA et al., 2018).

3.1 Ação do *Trichoderma* na promoção de crescimento e síntese de metabólitos especiais das plantas

As interações biológicas existentes no ecossistema possuem papel fundamental por garantir a sobrevivência de todas as espécies, seja de plantas, animais ou outros seres vivos (GONÇALVES, 2015; LOVATTO et al., 2012; BROWN, 2002). E, além das interações intra/interespecíficas que são encontrados no solo, as plantas também apresentam microrganismos associados aos seus órgãos vegetais, denominados de fungos endofíticos, sendo encontrados em todos os vegetais (FIRÁKOVÁ et al., 2007; STROBEL; DAISY, 2003).

Os fungos do gênero *Trichoderma* tem sido bastante estudados, uma vez que estes têm se destacado na promoção de crescimento e no florescimento dos vegetais (MOREIRA et al., 2022). Esse mecanismo relaciona-se ao fato de o *Trichoderma* atuar na solubilização e absorção de nutrientes, promovendo o aumento da superfície de absorção; causar a diminuição dos níveis de etileno nas plantas, o que resulta em seu crescimento; aumentar a eficiência do uso do nitrogênio; melhorar a atividade fotossintética e amenizar os efeitos causados pelo estresse ambiental (MEYER, MAZZARO; SILVA, 2019; MOREIRA et al, 2022).

O uso desse microrganismo pode também estimular a síntese de metabólitos especiais nos vegetais. Segundo SIRIN et al. (2022) houve um aumento de aproximadamente 60% na produção de óleo essencial e frutos em plantas de coentro quando submetidas ao tratamento com *Trichoderma asperellum* B35. Quando este fora combinado, houve diminuição da biomassa da parte aérea e acúmulo de alguns compostos fenólicos (MING et al., 2013).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a qualidade das mudas, desenvolvimento em campo e biossíntese de metabólitos especiais de *Lippia alba* inoculada com *Trichoderma*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): Levantamento de publicações nas áreas químicas, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.1, p.79-84, 2005.
- ALTIERI, M. A. Agroecología: principios y estrategias para diseñar sistemas agrarios sustentables. In: SARANDON, S. J. **Agroecología: el camino hacia una agricultura sustentable**. Buenos Aires – La Plata, 2002.
- BATISTA, J. A.; BOTREL, P. P.; FIGUEIREDO, F. C. Efeito do extrato de tiririca e bioestimulante no enraizamento de estacas de *Hyptis marrubioides* Epl. **Revista Agroambiental, Pouso Alegre**, v. 7, n. 2, p. 91-99, 2015.
- BISPO, L. P. et al. Effect of indolebutyric acid and cutting type on vegetative propagation of three *Lippia* species. **Ciência Rural**, v. 46, n. 8, p. 1364-1367, 2016.
- BIASI, L. A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural [online]**. v.33, n.3, p.455-459, 2003.
- BORSATO, A. V.; FEIDEN, A. Biodiversidade funcional e as plantas medicinais, aromáticas e condimentares. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, 11p, .2011
- BORSATO, A. V.; SILVA, A. DA.; SANTOS, A. G. dos.; JORGE, M. H. A.; Plantas medicinais e agroecologia: uma forma de cultivar o saber popular na região de Corumbá, MS. Corumbá: **Embrapa Pantanal**. Corumbá (MS), 2009.
- CARDOSO, P. H; CABRAL, A.; SILVA, F.S.; SALIMENA, F.R.G. Verbenaceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, 2020.
- CAMÊLO, L. C. A. Caracterização de germoplasma e sazonalidade em erva cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. 80 p. **Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)**. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão – Sergipe, 2010.
- COSTA, P.S.; SOUZA, E.B.; BRITO, E. H.S.; FONTENELLE, R. O. S. **Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae)**, Hoehnea, 2017.
- CUMMINGS NJ, AMBROSE A., BRAITHWAITE M., BISSETT J., ROSLAN HA, ABDULLAH J., STEWART A., AGBAYANI FV, STEYAERT J., HILL RA **Diversidade de tricoadermia endofítica de raiz de Bornéu da Malásia** Mycol. Progresso, p. 50, 2016.
- ELGUEA-CULEBRAS, O. G., BRAVO, M. E., SÁNCHEZ-VIOQUE, R. Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market – A review, **Industrial Crops and Products**, v.175, 2022.
- FERON, G.; BONNARME, P.; DURAND, A. **Prospects for the microbial production of food flavours**. **Trends in Food Science & Technology**, Volume 7, p. 285-293, 1996
- FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, Bratislava, v. 62, p. 251-257, 2007.

- GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo Secundário de Plantas. Reduca (Biología). **Serie Fisiologia Vegetal**, v.2, n.3, p.119 -145, 2009.
- GARCÍA LT, LEAL AF, MORENO EM STASHENKO EE, ARTEAGA HJ Differential anti-proliferative effect on K562 leukemia cells of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils produced under diverse growing, collection and extraction conditions. **Industrial Crops and Products** v. 96:140-148, 2017.
- GLAMOČLIJA J, SOKOVIĆ M, TEŠEVIĆ, V, LINDE GA, COLAUTO NB. Chemical characterization of *Lippia alba* essential oil: an alternative to control green molds. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 42(4):1537-1546, 2011.
- GOMES et al. Quintal da saúde: plantas medicinais na promoção do cuidado. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.3, p.32567-32574, 2021.
- GOMES, J. V. D.; FAITANINI, Rafael D.; BRASILEIRO, B. G.; SILVEIRA, D.; JAMAL, C. M. Phytochemical screening, thrombolytic and citotoxic activity evaluation of *Cecropia hololeuca* Miq. (Urticaceae), *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson (Verbenaceae) and *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Rutaceae). **Infarma-Pharm Sci**, v. 28, n. 1, p. 10-5, 2016.
- GONÇALVES, A.H. et al., Atividade fungitóxica in vitro dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Revista Brasileira de plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1007-1015, 2015.
- LIMA I.O. et al., Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.2, p.186-190, 2007
- MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. Trichoderma: Uso na agricultura. **EMBRAPA**. 538 p. Brasilia, 2019.
- MENDOZA-MENDOZA, A.; ZAID, R.; LAWRY, R.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; HORWITZ, B.; MUKHERJEE, P. K. Molecular dialogue between *Trichoderma* and roots. Role of the fungal secretome. **Fungal Biology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 62-85, 2018.
- MING O, et al. Elicitors from the endophytic fungus *Trichoderma atroviride* promote *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, p.5687–5694, 2013.
- MOREIRA, G. C. et al., *Trichoderma* no controle biológico e promoção de crescimento vegetal. **Ciências agrárias [livro eletrônico]**, v. 1, 14 p. Rio de Janeiro, 2022.
- NAVROSKI, M. C. et al. Initial growth of seedlings of *Eucalyptus dunnii* Maiden as influenced by the addition of natural polymer and farming substrates. **Revista Árvore**, v. 40, n. 4, p. 627-637, 2016.
- OLIVEIRA, A. R. M. F. et al. Leaf anatomy and essential oil production in native species of *Lippia*. **BRAZILIAN JOURNAL OF AGRICULTURE-Revista de Agricultura**, v. 93, n. 3, p. 324-335, 2019.
- OLIVEIRA, L. M. et al. Vegetative propagation of *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. and *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 73-78, 2011.

- PANDELÓ D, MELO TD, SINGULANI JL, GUEDES FAF, MACHADO MA, COELHO CM, VICCINI LF, SANTOS MO. Oil production at different stages of leaf development in *Lippia alba*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v.22, p:497-501, 2012.
- PANDEY AK, SONKER N, SINGH P (2016). Efficacy of some essential oils against *Aspergillus flavus* with special reference to *Lippia alba* oil a inhibitor of fungal proliferation and aflatoxin b1 production in green gram seeds during storage. **Journal of Food Science** v. 81, 2016.
- PANCHE, A N et al. "Flavonoids: an overview. " **Journal of nutritional science** vol. 5 e.47. 2016.
- PEIXOTO, A. S. J. Caracterização fitoquímica de extrato e óleo essencial da *Lippia alba* com potencial atividade antimicrobiana. **Monografia** (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG. – Cuité: CES, 2019.
- PERERA, W. H. et al. Essential oil constituents from high altitude Brazilian species with antimicrobial activity: *Baccharis parvidentata* Malag., *Hyptis monticola* Mart. ex Benth. and *Lippia organoides* Kunth. **Journal of Essential oil rEsEarch**, v. 29, n. 2, p. 109-116, 2017.
- REBOCHO, A.M.C.Z.T. Produção de plantas medicinais para a indústria farmacêutica. **Dissertação** (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto superior de Ciências da Saúde Egas Moniz/ ICS, 2015.
- ROCKENBACH, A.P. et al. Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [S.l.], v. 17, n. 1, p. 59-70, mar. 2018.
- SALIMENA FRG, MÚLGURA ME. Taxonomic notes in verbenaceae of Brazil. **Rodriguésia** v.66(1), p:191-197, 2015.
- SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B. S.; PETRINI, O.; SCHROERS, H. J.; DRUZHININA, I. S. **The *Trichoderma koningii* aggregate species.** **Stud Mycol**, v. 56, p. 67-133, 2006.
- SILVA, G. C. et al. Propagação vegetativa de alecrim-de-tabuleiro (Verbenaceae): uma espécie medicinal do semi-árido. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 2, 2015.
- SILVEIRA, A. C. et al. Estudo da Composição dos Óleos Essenciais de três Genótipos de *Eucalyptus spp*. In: **Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMANA DE APERFEIÇOAMENTO EM ENGENHARIA FLORESTAL DA UFPR, Curitiba. Anais. Curitiba: CIFLOMA, 2018.
- SIRIN et al. Turkish Journal of Agriculture - **Food Science and Technology**, 10(2): 166-173, 2022.
- SOUZA, J. M. A. et al. Biostimulant and substrates on litchi tree propagation by air layering. **Comunicata Scientiae**, v. 7, n. 1, p. 122-128, 2016.
- TAVARES, I. B.; MOMENTE, V. G.; NASCIMENTO, I. R. *Lippia alba*: estudo químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada na Ciências Agrárias**, v.4, n.1, p.204-220, 2011.

TELES, S. et al. Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* HBK. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 169-176, 2014.

TOFIÑO-RIVERA A, ORTEGA-CUADROS M, GALVIS-PAREJA D, JIMÉNEZ-RIOS H, MERINIE LJ, MARTÍNEZ-PABÓN MC. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology** v. 194, p:749-754, 2016.

TREVISAN MTS, MARQUES RA, SILVA MG, SCHERER D, HAUBNER R, ULRICH CM, OWEN RW (2016). Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: identification, quantitation and antioxidant capacity. **Records of Natural Products** 10(4):485-496.

WAGHUNDE R.R, R.M SHELAK, A.N SABALPARA **Trichoderma: um fungo significativo para a agricultura e meio ambiente** Afr. J. Agric. Res., 11 (2016), pp. 1952 – 1965

Zhu ZX, Zhuang WY. **Espécies de *Trichoderma* (*Hypocrea*) com ascósporos verdes da China** Persoônia, 34 (2015), pp. 113 - 129

CAPÍTULO 1

**PRODUÇÃO DE MUDAS E TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba*
(MILL.) N.E.Br ex Britton & P. Wilson EM DIFERENTES SUBSTRATOS COM
INOCULAÇÃO DE *Trichoderma asperellum***

SINARA MIRANDA LIMA

CRUZ DAS ALMAS

2022

PRODUÇÃO DE MUDAS E TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N.E.Br ex Britton & P. Wilson EM DIFERENTES SUBSTRATOS COM INOCULAÇÃO DE *Trichoderma asperellum*

Resumo: A *Lippia alba* é muito utilizada devido às suas propriedades medicinais e por produzir óleo essencial que são utilizados em vários segmentos da indústria e necessita ter sua cadeia produtiva desenvolvida para aumento da produção desse bioativo. O primeiro passo de uma cadeia produtiva, é a produção de mudas. A qualidade das mudas sofre grande influência do substrato, e está diretamente relacionado ao material utilizado na sua formulação. O hidrogel associado ao *Trichoderma* spp. pode melhorar as propriedades do substrato, favorecendo o crescimento das mudas. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do *Trichoderma asperellum* na produção de mudas de *Lippia alba*, visando ampliar o potencial produtivo. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 4 tratamentos (T1- Controle, T2- Hidrogel, T3- *Trichoderma* + Hidrogel e T4- *Trichoderma*) com 20 repetições. Foi aplicado 10 ml (10^7 esporos/ml) a cada quinze dias da suspensão dos esporos de *Trichoderma* nas plantas. Foram avaliadas variáveis fitotécnicas e teor de óleo essencial das plantas com 15 dias e com 30 dias após a aplicação. As médias das variáveis analisadas foram submetidas a análise de variância e teste de Tukey com auxílio do programa R. Os tratamentos influenciaram significativamente a massa fresca, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz das mudas de *Lippia* aos 15 dias e a altura, massa fresca de raiz, comprimento de raiz, número de hastes e teor de óleo essencial das mudas aos 30 dias. Os resultados indicam que separadamente o hidrogel e *Trichoderma* proporcionam um efeito positivo no incremento de fitomassa das mudas de *Lippia*, aos 15 dias. Aos 30 dias, o *Trichoderma* proporcionou os maiores valores de altura, comprimento de raiz, número de hastes e massa fresca da raiz. Nos dois períodos de análise a ação conjunto do hidrogel e *Trichoderma* teve efeito negativo, principalmente para o sistema radicular. O teor de óleo essencial foi maior nas mudas do controle, se diferenciando dos demais tratamentos. Portanto, associar o *Trichoderma* a produção de mudas de *L. alba* pode estimular seu crescimento, acúmulo de biomassa e desenvolvimento produtivo, porém não estimula a produção de óleo essencial.

Palavras-chave: bioativo, microrganismos, interações

SEEDLINGS PRODUCTION AND ESSENTIAL OIL CONTENT OF *Lippia alba* (MILL.) N.E.Br ex Britton & P. Wilson IN DIFFERENT SUBSTRATES WITH INOCULATION OF *Trichoderma asperellum*

Abstract: *Lippia alba* is widely used due to its medicinal properties and for producing essential oil that are used in various industry segments and needs to have its production chain developed to increase the production of this bioactive. The first step in a production chain is the production of seedlings. The quality of the seedlings is greatly influenced by the substrate, and is directly related to the material used in its formulation. The hydrogel associated with *Trichoderma spp.* can improve the properties of the substrate, favoring the growth of seedlings. Therefore, this work aimed to evaluate the influence of *Trichoderma asperellum* in the production of *Lippia alba* seedlings, aiming to increase the productive potential. The design used was completely randomized, containing 4 treatments (T1- Control, T2- Hidrogel, T3- *Trichoderma* + Hidrogel and T4- *Trichoderma*) with 20 repetitions. 10 ml (10^7 spores/ml) was applied every fortnight of suspension of *Trichoderma* spores on the plants. Phytotechnical variables and essential oil content of plants were evaluated 15 days and 30 days after application. The averages of the variables analyzed were submitted to analysis of variance and Tukey's test with the aid of the R program. The treatments significantly influenced the fresh mass, dry mass of the aerial part and dry mass of the root of the *Lippia* seedlings at 15 days and the height, root fresh mass, root length, number of stems and essential oil content of seedlings at 30 days. The results indicate that separately the hydrogel and *Trichoderma* provide a positive effect on the increment of phytomass of *Lippia* seedlings, at 15 days. At 30 days, *Trichoderma* provided the highest values for height, root length, number of stems and root fresh mass. In both periods of analysis, the joint action of the hydrogel and *Trichoderma* had a negative effect, mainly on the root system. The essential oil content was higher in the control seedlings, differing from the other treatments. Therefore, associating *Trichoderma* with the production of *L. alba* seedlings can stimulate its growth, biomass accumulation and productive development, but it does not stimulate the production of essential oil.

Keywords: bioactive, microorganisms, interactions

1. Introdução

Lippia alba (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) conhecida popularmente como erva-cidreira, é uma planta medicinal amplamente utilizada na medicina popular em diferentes regiões da América Central e do Sul no tratamento de diversas doenças (COSTA et al., 2020; GOMES et al., 2018). Possui atividades biológicas significativas, como antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensivo, entre outras (COSTA et al., 2020). Essas atividades biológicas só são possíveis devido à presença de componentes bioativos, resultante do metabolismo especial desse vegetal. Entre os metabólitos especiais que a *L. alba* possui, estão os óleos essenciais, que são compostos voláteis, uma mistura de hidrocarbonetos saturados e insaturados, álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e terpenos (ALI et al, 2015).

Diversos fatores podem influenciar na produção de biomassa, no rendimento e na composição do óleo essencial de plantas medicinais, dentre eles destaca-se a produção e obtenção de mudas de qualidade, sendo um fator essencial no início de uma cadeia produtiva (MARTINS,1998; MENEZES, 2006). A qualidade das mudas sofre grande influência do substrato, e está diretamente relacionado ao material utilizado na sua formulação (PASCUAL et al., 2018). O hidrogel associado ao *Trichoderma spp.* pode ser boa estratégia para melhorar as características químicas, físicas e biológicas dos substratos e assim favorecer o crescimento das mudas de *L. alba*.

Os Hidrogéis são materiais formados por uma rede de polímeros com características hidrofílicas quando secos, apresentam-se na forma de pequenos grânulos e que possuem a capacidade de dispersar a água entre suas cadeias, promovendo a formação de um gel e geralmente resultando no inchamento do material que pode ocorrer naturalmente ou ser sintetizados (AHMED, 2015).

Fungos do gênero *Trichoderma* tem sido amplamente utilizados como agente promotor de crescimento e biocontrole na agricultura, podem agir de forma direta (antibiose, produção de enzimas e competição por nutrientes) ou indireta (indução de resistência) no controle de fitopatógenos. A indução de resistência em plantas pode ocorrer por meio da produção e secreção de moléculas estimuladoras (GOMES et al., 2015). As moléculas estimuladoras produzidas pelo *Trichoderma* ativam a expressão dos genes envolvidos no sistema de defesa da planta e também promove o seu crescimento, o desenvolvimento das raízes e aumenta a disponibilidade de nutrientes (GOMES et al., 2017). Por isso fungos desse gênero têm sido bastante estudados. Desse modo, o objetivo

deste estudo foi avaliar a influência do *Trichoderma* e hidrogel na produção de mudas e no teor de óleo essencial de *Lippia alba* cultivadas em casa de vegetação.

2. Materiais e Métodos

2.1 Condições experimentais

O experimento foi conduzido na Biofábrica situada na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- UFRB e as análises foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica da UFRB, Campus Cruz das Almas-Bahia. As mudas de *Lippia alba* foram obtidas a partir de estacas retiradas de plantas matrizes, situadas na área experimental da UFRB, município de Cruz das Almas-BA. O isolado utilizado foi o *Trichoderma asperellum*, codificado como TCS 87, obtido da coleção de microrganismos do laboratório de Microbiologia da UFRB.

As estacas com aproximadamente 20 cm de comprimento e 1 par de folhas reduzidas foram colocadas para enraizar em sacos de polietileno contendo mistura de solo e húmus (2:1) e outras em sacos contendo a mistura de solo, húmus e hidrogel (3,5g kg⁻¹). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 4 tratamentos (T1- Controle, T2- Hidrogel, T3- *Trichoderma* + Hidrogel e T4- *Trichoderma*) e 20 repetições, totalizando 80 unidades experimentais.

2.2 Preparo de suspensão

Para obtenção dos isolados, os fungos foram replicados em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) diluídos para 1/5 e mantidos em B.O.D. com temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Após o crescimento dos microrganismos, foi adicionada a placa de Petri água destilada estéril e feita à raspagem dos propágulos fúngicos com auxílio da alça de Drigalsky esterilizada, posteriormente foi realizada a contagem dos esporos com auxílio da câmara de Neubauer e feito o ajuste da concentração para 10⁷ esporos/mL, onde foram inoculados 10 mL da suspensão quinzenalmente na base das plantas (T3 e T4).

2.3 Variáveis fitotécnicas

Foram avaliados 15 dias após a aplicação do *Trichoderma* as seguintes variáveis de crescimento: Altura da planta e comprimento da raiz (régua), em centímetros, número de hastes e de folhas (contagem), diâmetro do caule (paquímetro), peso fresco das folhas e radicular com o auxílio de uma balança semianalítica (g), peso seco das folhas e radicular, em gramas, ambos submetidos ao processo de secagem em estufa de ventilação forçada a 45°C e 65°C até que o peso se mantenha constante e em seguida pesados com o auxílio de uma balança semianalítica.

2.3 Extração e teor de óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação, no equipamento Clevenger. Após a secagem a 45°C das folhas em estufa com circulação forçada, as folhas foram colocadas num balão volumétrico com capacidade para 2L, em seguida foi adicionada água destilada necessária para cobrir todo o material vegetal. O balão foi comportado numa manta térmica, dando início ao processo de hidrodestilação. O processo de extração durou em torno de 120 minutos contando a partir da condensação da primeira gota. Após o processo de extração, o óleo essencial foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, pesado em balança analítica e colocado em um recipiente de vidro com capacidade de 2ml, etiquetado e armazenado sob refrigeração, ao abrigo da luz até o momento do uso.

Para determinação do teor de óleo essencial foi utilizada a equação descrita por Santos et al. (2004):

$$TO = V_o/B_m \times 100$$

onde,

TO = teor de óleo essencial em porcentagem (mL de óleo essencial em 100g de biomassa úmida).

V_o = volume de óleo essencial lido na escala do tubo separador.

B_m = biomassa vegetal

100 = fator de conversão para porcentagem.

2.4 Análise estatística

Os dados do experimento foram submetidos a análise de variância, e de acordo a significância do teste, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de significância com o auxílio do programa R Development Core Team (2022)

3. Resultados e Discussão

3.1 Crescimento e teor de óleo essencial de mudas de *Lippia alba*

Os resultados encontrados podem ser observados nos gráficos 1, 2, 3, 4 e 5, e demonstram que os tratamentos exerceram influência nas variáveis analisadas. Após 15 dias da aplicação do *Trichoderma* (**Gráfico 1**) é possível observar que a altura das plantas e comprimento de raiz não teve muita variação dentre os tratamentos. Já aos 30 dias, observa-se efeito dos tratamentos, onde as mudas inoculadas com o *Trichoderma* (T4) apresentaram maior altura, comprimento de raiz, porém, com valor bem próximo as do controle (T1). Esses resultados indicam que são necessários pelo menos 30 dias para que o *Trichoderma* tenha algum efeito quantificável nas mudas de *Lippia*. Na altura das mudas observa-se um incremento de 15,1% com a inoculação do *Trichoderma* em relação ao T1, e um incremento de 20% em relação ao tempo (15 dias).



Gráfico 1- Altura e comprimento de raiz de mudas de *Lippia alba* com 15 e 30 dias após inoculação com *Trichoderma*

Comparando o efeito da inoculação dos isolados de *Trichoderma sp.* no substrato em ausência de vermicomposto, Amaral et al. (2017) observou que as mudas apresentaram maior crescimento em altura quando inoculadas com o isolado *Trichoderma*

asperelloides. Em seus estudos Contreras-Cornejo et al., (2016) afirmaram que uma grande área superficial de raízes devido a inoculações com *Trichoderma*, permite que a raiz explore uma maior região do solo, permitindo que a planta absorva mais macro e micronutrientes do solo conferindo a planta, vantagens adaptativas, como por exemplo na competição por minerais, quando estes estão escassos.

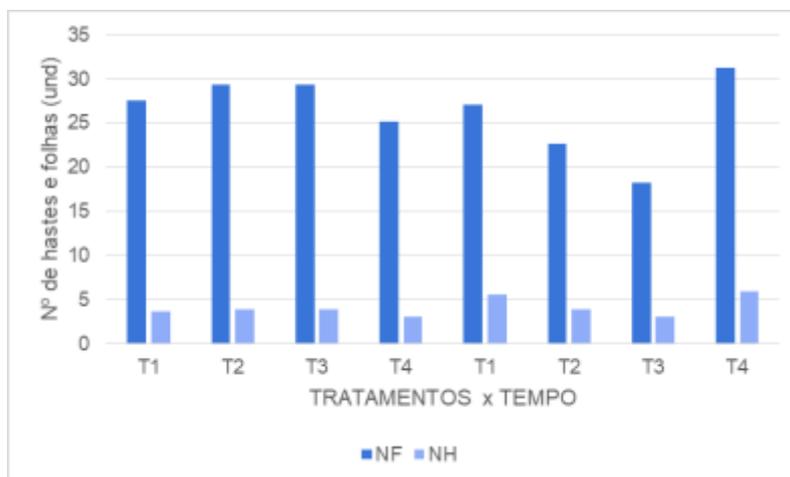


Gráfico 2- Número de hastes e folhas de mudas de *Lippia alba* com 15 e 30 dias após a inoculação com *Trichoderma*

O número de folhas e de hastes (**Gráfico 2**) apresentou alterações de valores entre os tratamentos semelhantes a altura e comprimento de raiz, ou seja, só após 30 dias, principalmente o T4, onde proporcionou mudas com maiores médias para essas variáveis. O incremento que a inoculação com *Trichoderma* aos 30 dias proporcionou em número de folhas chegou a 15,2 % em relação ao T1 e chegou a 19,3 % em relação ao tempo de inoculação (15 dias). O aumento no número de hastes pode contribuir no aumento do número de folhas, estas são importantes na produção de fotoassimilados nas plantas.

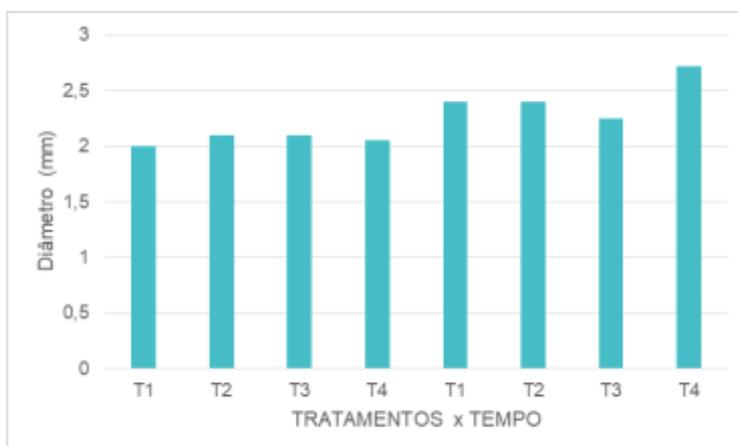


Gráfico 3- Diâmetro do caule de mudas de *Lippia alba* com 15 e 30 dias após a inoculação com o *Trichoderma*

Para o diâmetro (**Gráfico 3**) houve um incremento mais acentuado aos 30 dias com a inoculação de *Trichoderma*, sendo esse incremento de 13,3 % em relação ao T1. Em estudos realizados por Mendonça e Silva (2019) foi possível observar que o uso do *Trichoderma* não surtiu efeito significativo no diâmetro do caule de mudas de diferentes genótipos de pimenta do reino. Já em mudas de carobas (*Jacaranda micranta*) o substrato quando fora inoculado com o *Trichoderma* apresentou um aumento significativo no diâmetro do caule (AMARAL et al., 2017).

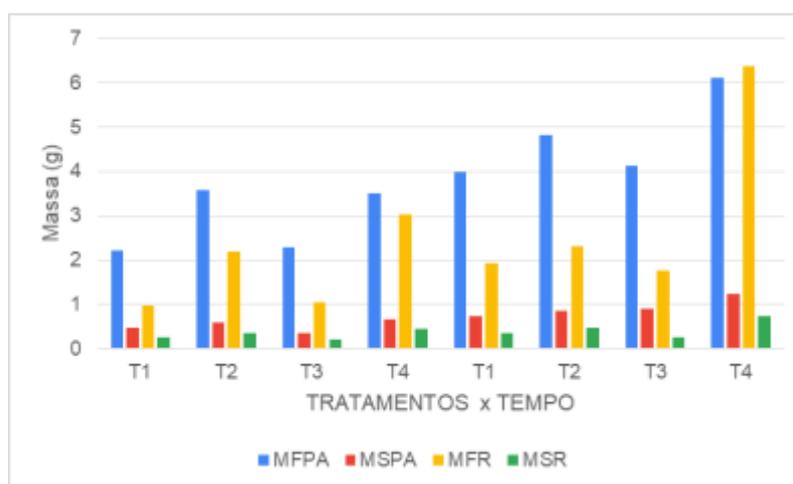


Gráfico 4- Massa seca e fresca da parte aérea e da raiz de mudas de *Lippia alba* com 15 e 30 dias após a inoculação com *Trichoderma*

No gráfico 4 é possível observar que há um aumento da fitomassa das mudas (**Figura 1**), onde podemos destacar os tratamentos T4 e T2 (Hidrogel). Isso vale tanto para os 15 quanto para os 30 dias, demonstrando que o *Trichoderma* e o hidrogel podem ter melhorado as condições física, químicas e biológicas do substrato, separadamente, pois observa-se que a união dos tratamentos (T3) não favoreceu nenhuma variável de crescimento analisada no trabalho. Os incrementos de massa fresca da parte aérea e raiz e massa seca da parte aérea e raiz que o *Trichoderma* proporcionou foi de 36,4%, 67,5% e 27,3%, 44,2% aos 15 dias e de 34,9%, 69% e 40%, 54% aos 30 dias, respectivamente. Já o hidrogel proporcionou incrementos de 38%, 55,5% e 20%, 27,3% aos 15 dias e de 17,4%, 5,9% e 13%, 29,2% aos 30 dias, respectivamente.

Segundo Felippe et al., (2020) em seus estudos em relação à massa seca radicular, caulinar e foliar, e área foliar, a adição de hidrogel elevou em aproximadamente 25% as médias, demonstrando o efeito positivo do polímero no crescimento das plantas e acúmulo de massa seca, por conta do fornecimento adequado de água, ou seja, à medida

que as mudas foram irrigadas com mais frequência, aumentaram as médias de todas estas variáveis, sendo que a maior disponibilidade hídrica possibilitou o maior desenvolvimento das plantas. Em estudos realizados por SIRIN *et al.*, (2022) utilizando espécies de *Trichoderma* em plantas de *Salvia miltiorrhiza* foi determinado que o extrato do micélio e a fração polissacarídica produzidos pelo *Trichoderma atroviride* D16 apresentaram efeitos sobre o crescimento e o metabolismo secundário de raízes pilosas promovendo o seu crescimento e estimulando a biossíntese de tanhions nessas plantas.



Figura 1: Imagem ilustrativa representando as mudas de cada tratamento com 15 e 30 dias após a aplicação da suspensão de esporos de *Trichoderma*. **Fonte:** Arquivo pessoal

O teor de óleo essencial produzido pelas mudas de *L. alba* (**Gráfico 5**) foi maior quando extraídos aos 30 dias com o tratamento T1, tendo um aumento no teor de 6,5%, em relação as mudas submetidas a esse mesmo tratamento aos 15 dias. O menor teor foi com o tratamento T3, aos 30 dias, sendo o valor de 0,52%.



Gráfico 5- Teor de óleo essencial de mudas de *Lippia alba* com diferentes tratamentos com 15 e 30 dias após a inoculação de *Trichoderma*.

3.2 Estatística univariada das variáveis analisadas

De acordo com análise de variância, os tratamentos influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a massa fresca, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz das mudas de *Lippia* aos 15 dias e a altura, massa fresca de raiz, comprimento de raiz, número de hastes e teor de óleo essencial das mudas aos 30 dias.

A massa fresca da parte aérea das mudas submetidas a inoculação com *Trichoderma* (T4) e hidrogel (T2) não se diferenciaram estatisticamente entre si, mas se diferenciaram das mudas do controle (T1) e da combinação dos dois tratamentos (T3), aos 15 dias. Já a massa seca da parte aérea e raiz, as mudas apresentaram maiores médias quando submetidas ao T4, mas não se diferenciaram estatisticamente das do tratamento T2 e T1, sendo os menores valores encontrados no tratamento T3 (**Tabela 1**).

Esses resultados indicam que separadamente o hidrogel e *Trichoderma* proporcionam um efeito positivo no incremento de fitomassa das mudas de *Lippia*, mas em conjunto esse efeito é negativo, principalmente para o sistema radicular. O sistema radicular tem grande importância na absorção de água e nutrientes, e a redução causada pelo tratamento T3 consequentemente diminui as demais variáveis de crescimento analisadas nas mudas.

Tabela 1: Massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de mudas de *Lippia alba* submetidas aos tratamentos controle, *Trichoderma* com hidrogel, *Trichoderma* s/ hidrogel e Hidrogel, com 15 dias após a inoculação.

Tratamentos	MFPA	MSPA	MSR
Controle (T1)	2,22 b	0,48 ab	0,24 ab
Hidrogel (T2)	3,57 a	0,60 a	0,33 ab
Hidrogel + <i>Trichoderma</i> (T3)	2,27 b	0,36 b	0,21 b
<i>Trichoderma</i> (T4)	3,49 a	0,66 a	0,43 a
CV %	33,88	39,48	49,48

*letras iguais na coluna não se diferenciaram entre si pelo teste de Tukey a 5%

Analisando a tabela 2, a altura, comprimento de raiz e número de hastes das mudas nos tratamentos T4, T2 e T1 não se diferenciaram entre si, estatisticamente. Para a massa

fresca da raiz, o tratamento T4 proporcionou a maior média, e se diferenciou estatisticamente dos demais tratamentos. O tratamento T3 influenciou negativamente nessas variáveis, proporcionando os menores valores.

Diversos mecanismos podem estar relacionados a promoção de crescimento das plantas devido à ação do *Trichoderma*, as quais incluem a síntese de fitohormônios seja pela planta ou pelo microrganismo, melhor eficácia na solubilização dos nutrientes presentes no solo, melhor absorção e translocação dos nutrientes, aumento na taxa fotossintética e dos mecanismos de defesa da planta, além de atuar no desenvolvimento do sistema radicular (STEWART, HILL, 2014).

Segundo Zin e Badaluddin (2020) o desenvolvimento da raiz é o benefício mais comum do *Trichoderma* para o crescimento de plantas, sendo explicado pela produção ou controle de hormônios vegetais que são responsáveis por melhorar o desenvolvimento radicular, como auxinas e ácido harzianico.

Tabela 2: Altura (ALT), massa fresca de raiz (MFR), Comprimento de raiz (CR) e número de hastes (NH) e teor de óleo essencial de mudas de *Lippia alba* submetidas aos tratamentos controle, *Trichoderma* com hidrogel, *Trichoderma* s/ hidrogel e Hidrogel, com 30 dias após a inoculação.

Tratamentos	ALT	MFR	CR	NH	TEOR
Controle (T1)	38,50 ab	1,92 b	23,35 a	5,60 a	1,23 a
Hidrogel (T2)	39,55 ab	2,04 b	20,30 ab	3,90 ab	0,67 b
Hidrogel + <i>Trichoderma</i> (T3)	34,56 b	1,75 b	14,11 b	3,00 b	0,52 b
<i>Trichoderma</i> (T4)	48,11 a	6,37 a	23,39 a	5,89 a	0,65 b
CV %	22,47	65,03	29,70	40,01	9,98

*letras iguais na coluna não se diferenciaram entre si pelo teste de Tukey a 5%

O teor de óleo essencial foi maior nas mudas do controle, se diferenciando dos demais tratamentos (**Tabela 2**). O *Trichoderma* pode ser considerado uma boa técnica de produção de mudas de *Lippia*, contudo nas condições estudadas e no tempo de avaliação (30 dias), esse efeito positivo não ocorreu no teor de óleo.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com o de Jesus (2020), que avaliou a influência de diferentes isolados de *Trichoderma* no teor de óleo essencial de mudas de *L.alba*, e pode concluir que os tratamentos testados influenciaram na quantidade de óleo essencial, onde as mudas que não receberam a aplicação do *Trichoderma* apresentaram maior teor de óleo essencial.

4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos associar o *Trichoderma* a produção de mudas de *L. alba* pode estimular seu crescimento e acúmulo de biomassa, podendo ser uma nova tecnologia a ser empregado no manejo das plantas. No entanto, o *Trichoderma* não proporcionou o maior teor de óleo essencial das mudas de *Lippia alba*.

5. Referências Bibliográficas

- AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**. v. 6, p. 105–121, 2015.
- ALI, B.; NA Al-Wabel; S. Shams; A. Ahmad; SA Khan & F. Anwar. **Óleos essenciais usados em aromaterapia: uma revisão sistêmica**. Asiático. Pac. J. Trop. Biomed. 2015.
- AMARAL, P. P. et al., Promotores de crescimento na propagação de caroba. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 90, p. 149-157, 2017.
- CONTRERAS-CORTEJO, H.A , L. Macías-Rodríguez , E. del-Val , J. Larsen. Funções ecológicas de *Trichoderma* spp. e seus metabólitos secundários na rizosfera: interações com plantas FEM **Microbiol. Eco** , 92 5: 601– 11, 2016.
- COSTA, P. S. et al. Antifungal Activity and Synergistic Effect of Essential oil from *Lippia alba* Against *Trichophyton rubrum* and *Candida* spp. **Rev. Virtual Quim**, v. 12, p. 1529-1540, 2020.
- FELIPPE, Dionéia et al. Crescimento, sobrevivência e trocas gasosas de mudas de eucalipto dunnii Mais uso de aplicação de regimes de irrigação de hidrogel. **Kurú , Cartago**, v. 17, n. 40, pág. 11, 2020.
- GOMES, A. F. et al., Simultaneous determination of iridoids, phenylpropanoids and flavonoids in *Lippia alba* extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography, **Microchemical Journal**, Volume 138, 2018.
- GOMES et al., A proteína Cerato-Platanina Epl-1 de *Trichoderma harzianum* está envolvida em micoparasitismo, indução de resistência de plantas e proteção da parede celular própria. **Sci. Rep.**, 2015.
- GOMES et al., Envolvimento da proteína *Trichoderma harzianum* Epl-1 na regulação dos genes relacionados à defesa de botulite virulência e tomate. Frente. **Plant Sci.**, 8, 2017.
- JESUS, V. F. *Lippia alba* (Mill) N. Brown ASSOCIADA ao *Trichoderma* spp.: BIOMASSA, ÓLEO ESSENCIAL E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das almas, 2020.
- MARTINS, E.R. **Plantas medicinais**. 2. ed. Viçosa: UFV – Imprensa Universitária, 220p. 1998.
- MENDONÇA D.P.; SILVA F.B.B. **Trichoderma e bactérias endofíticas para promoção de Crescimento na aclimatização e formação de mudas de Pimenteira-do-reino provenientes do cultivo in vitro**. TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (Graduação em Agronomia) UFRA, Belém-PA, 2019.
- MENEZES E.L.A. Controle biológico: na busca pela sustentabilidade da agricultura brasileira. **Campo e negócios**. Uberlândia. 2006. PASCUAL, Jose Antonio et al. Organic substrate for transplant production in organic nurseries. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, n. 3, p. 1-23, 2018.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL < <https://www.R-project.org/> >

SANTOS, A. S.; ALVES, S. de M.; BAKER, D.; ROCHA NETO, O. **Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 6p. 2004

SIRIN et al. Turkish Journal of Agriculture - **Food Science and Technology**, 10(2): 166-173, 2022.

STEWART, A., HILL, R. Chapter 31 - Applications of Trichoderma in Plant Growth Promotion. Biotechnology and Biology of Trichoderma, **Elsevier**, 2014. ZIN, N. A., BADALUDDIN, N. A., Biological functions of Trichoderma spp. for agriculture applications, **Annals of Agricultural Sciences**, Volume 65, Issue 2, 2020

CAPÍTULO 2

**BIOMASSA, TEOR E COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Lippia alba* (MILL.)
N.E.Br ex Britton & P. Wilson ASSOCIADAS AO *Trichoderma asperellum***

SINARA MIRANDA LIMA

CRUZ DAS ALMAS

2022

**BIOMASSA, TEOR E COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Lippia alba* (MILL.)
N.E.Br ex Britton & P. Wilson ASSOCIADAS AO *Trichoderma asperellum***

Resumo: Os fungos do gênero *Trichoderma* tem sido utilizados, entre seus diversos potenciais, como promotores de crescimento vegetal, pois, secretam compostos que atuam no sistema radicular. Assim, os mesmos podem ser utilizados produção de plantas medicinais, como a *Lippia alba* que é amplamente utilizada devido as suas propriedades medicinais e por produzir óleo essencial. Associar o *Trichoderma* a produção de mudas de *L. alba* poderá estimular a produção de biomassa e aumentar a produção de metabólitos especiais. Logo, este estudo tem por objetivo analisar a influência do *Trichoderma asperellum* em diferentes tempos após a inoculação, na produção de biomassa e metabólitos especiais das plantas de *L.alba*. As mudas cultivadas em casa de vegetação foram transplantadas para o campo experimental. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas no tempo, onde foram inoculados 10 mL da suspensão quinzenalmente na cova, próximo a base das plantas. Foram avaliadas variáveis fitotécnicas e os metabólitos especiais das plantas com 0, 15, 30 e 45 dias após a aplicação. As médias das variáveis analisadas foram submetidas a análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância e regressão, com auxílio do programa R. Aos 45 dias, todas as variáveis analisadas apresentaram diferenças significativas, as plantas de *L. alba* que foram cultivadas com o microrganismo apresentaram médias superiores as plantas do controle, indicando que três aplicações da suspensão de *Trichoderma* já é o suficiente para aumentar o crescimento e o acúmulo de fitomassa dessas plantas. Com relação a produção de metabólitos especiais, só houve diferença significativa no teor de óleo essencial aos 45 dias, ou seja, com três aplicações de *Trichoderma*, o qual proporcionou o maior teor de óleo essencial. Já com os fenólicos totais, só houve diferença significativa aos 15 dias, onde o cultivo com *Trichoderma* proporcionou uma maior biossíntese de compostos fenólicos. Para os flavonoides totais o único período que não houve diferença entre as plantas cultivadas com e sem *Trichoderma* foi aos 45 dias, sendo que o *Trichoderma* aumentou a concentração desse fitoquímico. Portanto, o *Trichoderma* na produção de plantas de *Lippia alba* favorece o acúmulo de biomassa e aumenta a produção, principalmente o teor de óleo essencial, obtendo o seu maior rendimento aos 45 dias, sendo esse, o melhor período de colheita das plantas.

Palavras chave: cultivo, metabólitos, biomassa

**BIOMASS, CONTENT AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM *Lippia alba*
(MILL.) N.E.Br ex Britton & P. Wilson ASSOCIATED WITH *Trichoderma
asperellum***

Abstract: Fungi of the genus *Trichoderma* have been used, among their many potentials, as plant growth promoters, as they secrete compounds that act on the root system. Thus, they can be used in the production of medicinal plants, such as *Lippia alba*, which is widely used due to its medicinal properties and for producing essential oil. Associating *Trichoderma* with the production of *L. alba* seedlings can stimulate the production of biomass and increase the production of special metabolites. Therefore, this study aims to analyze the influence of *Trichoderma asperellum* at different times after inoculation, on the production of biomass and special metabolites of *L.alba* plants. The seedlings grown in a greenhouse were transplanted to the experimental field. The experimental design was in randomized blocks, in a split-plot scheme, where 10 mL of the suspension were inoculated every two weeks in the pit, close to the base of the plants. Phytotechnical variables and special plant metabolites were evaluated at 0, 15, 30 and 45 days after application. The means of the analyzed variables were submitted to analysis of variance and Tukey's test at 5% of significance and regression, with the aid of the R program. At 45 days, all the analyzed variables showed significant differences, the *L. alba* plants that were cultivated with the microorganism showed higher averages than the control plants, indicating that three applications of the *Trichoderma* suspension is enough to increase the growth and accumulation of phytomass in these plants. Regarding the production of special metabolites, there was only a significant difference in the essential oil content at 45 days, that is, with three applications of *Trichoderma*, which provided the highest essential oil content. As for the total phenolics, there was only a significant difference at 15 days, where the cultivation with *Trichoderma* provided a greater biosynthesis of phenolic compounds. For total flavonoids, the only period in which there was no difference between plants grown with and without *Trichoderma* was at 45 days, with *Trichoderma* increasing the concentration of this phytochemical. Therefore, *Trichoderma* in the production of *Lippia alba* plants favors the accumulation of biomass and increases production, mainly the essential oil content, obtaining its highest yield at 45 days, which is the best period for harvesting the plants.

Keywords: cultivation, metabolites, biomass

1. Introdução

O potencial curativo apresentado por diversas espécies medicinais, só é possível devido à presença de compostos bioativos que são resultantes do metabolismo secundário da planta (CARDOSO et al., 2019). Esses compostos são chamados de metabólitos e são utilizados estrategicamente pelo vegetal para a defesa e sobrevivência, protegendo a planta de predadores herbívoros, ataques de pragas e patógenos, condições climáticas adversas e atuando também como compostos sinalizadores atrativos de polinizadores e antioxidantes (WINK, 2015).

Segundo Zotti-Sperotto et al. (2021) em algumas espécies de plantas medicinais, as suas propriedades curativas são atribuídas aos compostos bioativos encontrados nos óleos essenciais, os quais se tratam de uma mistura complexa de substâncias, com alto poder de volatilização e um odor bastante característico. A família Verbenaceae apresenta diversas espécies de interesse comercial devido a sua composição aromática, tendo como destaque aquelas do gênero *Lippia*, que produzem óleos essenciais e são bastante utilizadas na medicina popular, assim como na indústria cosmética e farmacêutica (OLIVEIRA et al., 2014, CASTILHO et al., 2019). A *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown se destaca pela produção de óleo essencial, que possui diferentes potenciais comprovados cientificamente, como: antibacteriano, antifúngico e alelopático (JESUS, 2020).

Diversos fatores podem influenciar na produção de biomassa, no rendimento e na composição do óleo essencial e compostos fenólicos de plantas medicinais, dentre eles destaca-se a produção e obtenção de mudas de qualidade e o cultivo (MARTINS, 1998; MENEZES, 2006).

Os fungos que fazem parte do gênero *Trichoderma*, são de grande importância para o aumento do crescimento vegetal, podendo influenciar positivamente na germinação de sementes, desenvolvimento e rendimento das culturas, graças a produção de substâncias que atuam na promoção de crescimento, melhorando a absorção de nutrientes pelas raízes, sendo de grande importância econômica para agricultura, uma vez que pode atuar como agente de controle de doenças de plantas, e ainda, como indutores de resistência nas mesmas (CHAGAS et al., 2017).

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do *Trichoderma*, em diferentes tempos após a inoculação, na produção de biomassa e de metabólitos especiais de *Lippia alba*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Condições experimentais

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental, localizada na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- UFRB e as análises foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica, no Bloco L, UFRB.

As mudas cultivadas em casa de vegetação foram transplantadas para o campo experimental, sendo realizado o plantio em covas, com espaçamento de 1m entre plantas e 1 m entre as linhas, utilizando uma pequena quantidade de húmus nas covas, no momento do plantio e ao final do dia foi realizada a aplicação de 10 ml da suspensão de *Trichoderma asperellum* nas mudas. Após 1 mês, todas as plantas foram podadas, padronizando-as em um tamanho médio de 40 cm. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas no tempo, com as plantas cultivadas com e sem *Trichoderma* nas parcelas principais e com os tempos de colheita nas subparcelas, com três repetições. Foram avaliadas as plantas cultivadas com e sem *Trichoderma* nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias após a aplicação do microrganismo.

2.2 Preparo e aplicação da suspensão

Para a obtenção da suspensão de esporos, os fungos foram replicados em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e mantidos em B.O.D. com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Após o crescimento dos microrganismos, foi adicionada a placa de Petri água destilada estéril e feita à raspagem dos propágulos fúngicos com auxílio da alça de Drigalsky esterilizada, e posteriormente foi realizada a contagem dos esporos com auxílio da câmara de Neubauer e feito o ajuste da concentração para 10^7 esporos/mL, onde foram inoculados 10 mL da suspensão quinzenalmente na cova, próximo a base das plantas.

2.3 Variáveis fitotécnicas

Foram avaliadas as seguintes variáveis : Altura da planta (utilizada como padrão a maior haste) e comprimento da raiz (régua), em centímetros, número de hastes e de

folhas (contagem), diâmetro das hastes (paquímetro), peso fresco das folhas e da raiz com o auxílio de uma balança semianalítica (g), peso seco das folhas e da raiz, em gramas, ambos submetidos ao processo de secagem em estufa de ventilação forçada a 45°C e 65°C até que o peso se mantenha constante e em seguida pesados com o auxílio de uma balança semianalítica.

2.4 Preparo do extrato

A preparação do extrato de *Lippia alba* foi determinada seguindo a metodologia descrita por Moreira et al. (2022). As folhas do material vegetal foram trituradas com auxílio de um almofariz e pistilo. Cerca de 0,15 g do material foi pesado e o volume de 15 mL de solução extratora hidroalcoólica (50% v v⁻¹) foram adicionadas as amostras, as quais foram sonicadas em um banho ultrassônico por 15 minutos, filtradas e armazenadas em geladeira até o momento do uso.

2.5 Determinação dos compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados pela metodologia descrita por Moreira et al. (2022), com algumas adaptações. Foram adicionados 300 µL da amostra do extrato, 1 mL de carbonato de sódio saturado e 300 µL de reagente Folin-Ciocalteu. As leituras foram feitas em um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 750 nm, após 60 min de reação à temperatura ambiente e sem luz. O teor total de compostos fenólicos foi calculado a partir da curva de calibração do ácido gálico e expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca.

2.6 Determinação dos flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Marques et al. (2012), adaptado. Foram adicionados 1,0 ml de extrato de *L. alba* e 2,0 mL de uma solução etanólica de AlCl₃ (5% m v⁻¹) e o volume foi ajustado para 10,0 mL com solução hidroalcoólica (40% v v⁻¹). A solução foi armazenada na ausência de luz por 30 minutos e, posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 408 nanômetros. Os flavonoides totais foram calculados a partir da curva de calibração de quercetina usada como padrão e expressa em miligramas de equivalente de quercetina por grama de matéria seca.

2.7 Extração e teor de óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação, no equipamento Clevenger. As folhas foram colocadas num balão volumétrico com capacidade para 2L, em seguida foi adicionada água destilada necessária para cobrir todo o material vegetal. O balão foi comportado numa manta térmica, dando início ao processo de hidrodestilação. O processo de extração durou em torno de 120 minutos contando a partir da condensação da primeira gota. Após o processo de extração, o óleo essencial foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, pesado em balança analítica e colocado em um recipiente de vidro com capacidade de 2ml, etiquetado e armazenado sob refrigeração, ao abrigo da luz até o momento do uso.

Para determinação do teor de óleo essencial foi utilizada a equação descrita por Santos et al., (2004):

$$TO = Vo/Bm - (Bm \times U/100) \times 100$$

onde,

TO = teor de óleo (ml de óleo essencial em 100 g de biomassa seca) ou rendimento de extração (%);

Vo = volume de óleo extraído (ml), lido diretamente na escala do tubo separador; Bm = Biomassa aérea vegetal, em gramas;

Bm x U/ 100 = quantidade de umidade ou água presente na biomassa;

Bm - Bm x U/100 = quantidade de biomassa seca isenta de água ou livre de umidade;

100 = fator de conversão para porcentagem.

2.8 Análise estatística

Os dados do experimento foram submetidos a análise de variância, e de acordo a significância do teste, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de significância e regressão com o auxílio do programa R Development Core Team (2022). Alguns dados foram transformados (número de hastes e massa seca das folhas) para atender aos pressupostos da análise estatística.

3. Resultados e Discussão

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) da interação do *Trichoderma* e do tempo em todas as variáveis analisadas. Observa-se na tabela 1 os tratamentos com e sem *Trichoderma* dentro dos tempos de avaliação. Na primeira avaliação (T0) só houveram

diferenças significativas para o diâmetro das hastes (DH) e massa seca das folhas (MSF), sendo que as plantas que foram cultivadas com o *Trichoderma* apresentaram maiores médias para estas variáveis. Na segunda avaliação (T15) as variáveis que se diferenciaram entre si, e que apresentando maiores médias cultivadas com *Trichoderma*, foram o diâmetro do caule (DH), o número de hastes (NH), o número de folhas (NF), a massa fresca das folhas (MSF), a massa fresca da raiz (MSR) e a massa seca das folhas (MSF). Já para altura (ALT) e comprimento da raiz (CR) as maiores médias obtidas foram para as plantas do controle (sem *Trichoderma*).

No tempo 30, todas as variáveis se diferenciaram entre si, onde as plantas cultivadas com duas aplicações de *Trichoderma* apresentaram as maiores médias, com exceção da ALT. Já na última avaliação (45 dias), todas as variáveis analisadas apresentaram diferenças significativas, as plantas de *L. alba* que foram cultivadas com o microrganismo apresentaram médias superiores as plantas do controle, indicando que três aplicações da suspensão de *Trichoderma* já é o suficiente para aumentar o crescimento e o acúmulo de fitomassa dessas plantas. Os incrementos proporcionados pelo *Trichoderma* aos 45 dias foram de 14,3% (ALT), 12,7% (DH), 42,6% (NH), 45,5% (NF), 63,5% (NI), 25,7% (CR), 45,5% (MFF), 39% (MFR), 64% (MFI), 38,4% (MSR), 58,3% (MSI) e 44% (MSF).

Esses resultados corroboraram com os estudos realizados por López et al. (2019), que utilizando cepas nativas de *Trichoderma* na promoção de crescimento da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foi possível observar que a inoculação de *Trichoderma atroviride*, *T. stibohypoxyl* e cepas de *T. koningiopsis* aumentaram significativamente a massa seca da parte aérea e a matéria seca total em relação às plantas não inoculadas.

Estudos realizados por Zhang et al. (2019), utilizando o *T. harzianum* T-soja, comprovaram que houve o aumento do peso fresco e seco de plantas de pepino, além de melhorar o crescimento da planta, como aumento da altura e tamanho da folha, promovendo o desenvolvimento radicular, evidenciando o aumento do número de raízes e comprimento da raiz.

Isso porque o fungo estimula o crescimento e o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, principalmente as raízes laterais, as quais fornecem uma maior superfície para colonização, trazendo benefícios para planta, uma vez que aumenta a superfície de absorção da raiz, aumentando também a capacidade de absorção de nutrientes e água (STEWART, HILL, 2014).

Segundo Meyer, Mazaró; Silva (2019) o *Trichoderma* causa a diminuição dos níveis de etileno nas plantas, o que resulta em maior crescimento, além de aumentar a massa seca, o verdor das folhas e ainda melhora a fotossíntese, que está diretamente relacionada com a assimilação de nitrogênio pelas plantas.

Em relação a produção de metabólitos especiais, só houve diferença significativa no teor de óleo essencial aos 45 dias, ou seja, com três aplicações de *Trichoderma*, o qual proporcionou o maior teor de óleo essencial. Já com os fenólicos totais, só houve diferença significativa aos 15 dias, onde o cultivo com *Trichoderma* proporcionou uma maior biossíntese de compostos fenólicos. Para os flavonoides totais o único período que não houve diferença entre as plantas cultivadas com e sem *Trichoderma* foi aos 45 dias, sendo que o *Trichoderma* aumentou a concentração desse fitoquímico.

Na produção de óleo essencial das plantas cultivadas com *Trichoderma*, aos 45 dias, houve um incremento de 86,4 % quando comparadas aquelas sem o uso do microrganismo. Já para os fenólicos totais, o incremento foi de 65%, com o uso de *Trichoderma* aos 15 dias. Os flavonoides houve incremento em três períodos avaliados utilizando o *Trichoderma*, no 0 com 25,8%, no 15 com 69% e no 30 com 52%.

Os resultados mostraram que o *Trichoderma* foi eficiente como um elicitador biótico na biossíntese de metabólitos especiais. Segundo Zapata-Sarmiento et al. (2020) o *Trichoderma* pode induzir as defesas dos vegetais de duas maneiras, direta, que incluem a competição por nutrientes, micoparasitismo e antibiose, e a indireta, induzindo a resistência da planta. A interação que o *Trichoderma* estabelece com as plantas induz diversas alterações nas rotas metabólicas relacionadas à sua defesa, incluindo a biossíntese de metabólitos especiais (PASCALE et al., 2017).

Tabela 1: Variáveis Altura (ALT), Diâmetro das hastes (DH), Número de hastes (NH), Número de folhas (NF), Número de inflorescência (NI), Comprimento da raiz (CP), Massa fresca das folhas (MFF), Massa fresca da raiz (MFR), Massa fresca da inflorescência (MFI), Massa seca da raiz (MSR), Massa seca da inflorescência (MSI), Massa seca das folhas (MFF), Fenólicos totais (FEN), Flavonoides totais (FLAV) e Teor de óleo essencial de *Lippia alba* analisadas em diferentes tempos de coleta, com e sem aplicação de *Trichoderma*

Variáveis	0		15		30		45		CV1	CV2
	ST	CT	ST	CT	ST	CT	ST	CT		
ALT (cm)	40 a	40 a	91 a	74,5 b	126,6 a	127,8 a	158,4 b	184,7 a	2,34%	2,14%
DH (mm)	2,74 b	3,47 a	3,24 b	4,35 a	3,8 b	5,19 a	4,3 b	4,92 a	4,16%	3,78%
NH	8,2 a	10,17 a	8,6 b	25,4 a	28,6 b	46,27 a	45 b	78,4 a	8,67%	8,10%
NF	113,6 a	154,83 a	219,4 b	482,8 a	593 b	794,2 a	862,6 b	1582,7 a	12,47%	6,47%
NI	8,2 a	17,08 a	29,2 a	50,2 a	104 b	183,4 a	149,8 b	411 a	24,16%	16,08%
CR (cm)	24,8 a	21,2 a	28,4 a	19,23 b	27 b	34,7 a	30 b	40,4 a	19,07%	10,28%
MFF (g)	12,78 a	19,09 a	25,34 b	76,58 a	78,85 b	147,14 a	110,46 b	202,73 a	11,07%	7,06%
MFR (g)	5,95 a	4,45 a	7,33 b	14,73 a	21,43 b	31,09 a	25,26 b	41,43 a	18,57%	14,83%
MFI (g)	0,30 a	0,44 a	1,41 a	1,50 a	4,11 b	7,36 a	7,10 b	19,82 a	30,50%	20,29%
MSR (g)	2,30 a	1,47 a	3,01 a	5,12 a	8,87 b	13,47 a	14,46 b	23,5 a	18,41%	13,27%
MSI (g)	0,16 a	0,15 a	0,49 a	0,52 a	1,56 b	3,28 a	4,17 b	10,0 a	12,23%	9,24%
MSF (g)	4,11 b	5,61 a	8,12 b	20,54 a	24,41 b	48 a	47,15 b	84,08 a	2,30%	2,82%
FEN (mg EAG g⁻¹)	21,18 a	21,29 a	6,7 b	19,19 a	11,22 a	17,53 a	12,07 a	12,57 a	22,38%	16,14%
FLAV (mg EQ g⁻¹)	7,01 b	9,45 a	2,57 b	8,3 a	3,01 b	6,33 a	4,16 a	3,79 a	29,06%	17,15%
TEOR (%)	0,63 a	0,43 a	0,69 a	0,55 a	1,00 a	1,07 a	0,18 b	1,29 a	28,3%	15,19%

Analisando as figuras (1, 2 e 3) o efeito do tempo de avaliação nas plantas que foram cultivadas com e sem *Trichoderma*, observa-se que o modelo linear foi o que melhor ajustou a variação das variáveis de crescimento analisadas em função do tempo, sendo que ao decorrer dos dias houve um aumento em todas as variáveis de crescimento analisadas, com exceção do diâmetro das hastes, que quando as plantas foram cultivadas com o *Trichoderma*, o modelo que melhor se ajustou foi o quadrático, onde as plantas atingiram o seu diâmetro máximo estimado (5,34 mm) os 35 dias e a partir daí há a diminuição desta variável.

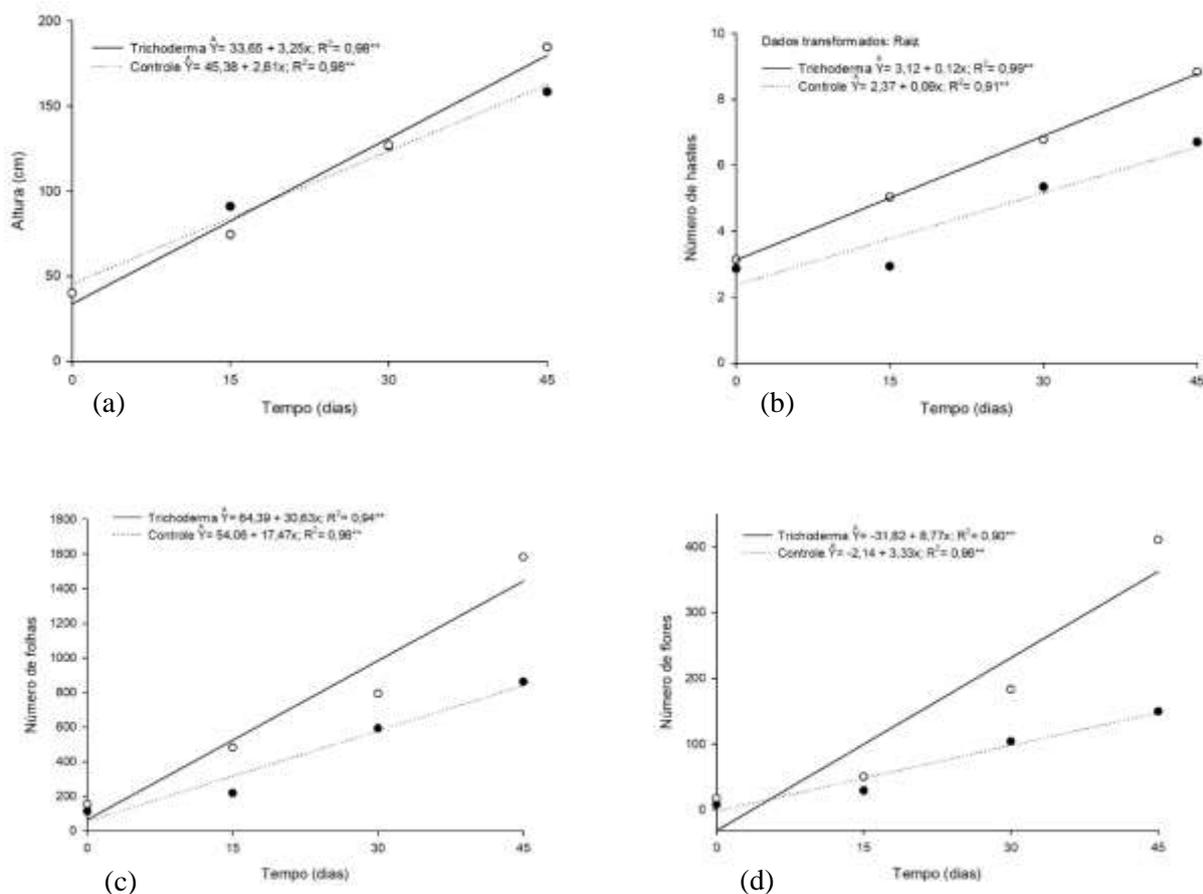


Figura 1: Altura (a), Número de hastes (b), Número de folhas (c), Número de flores (d) de *Lippia alba*, cultivadas com e sem *Trichoderma* nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias.

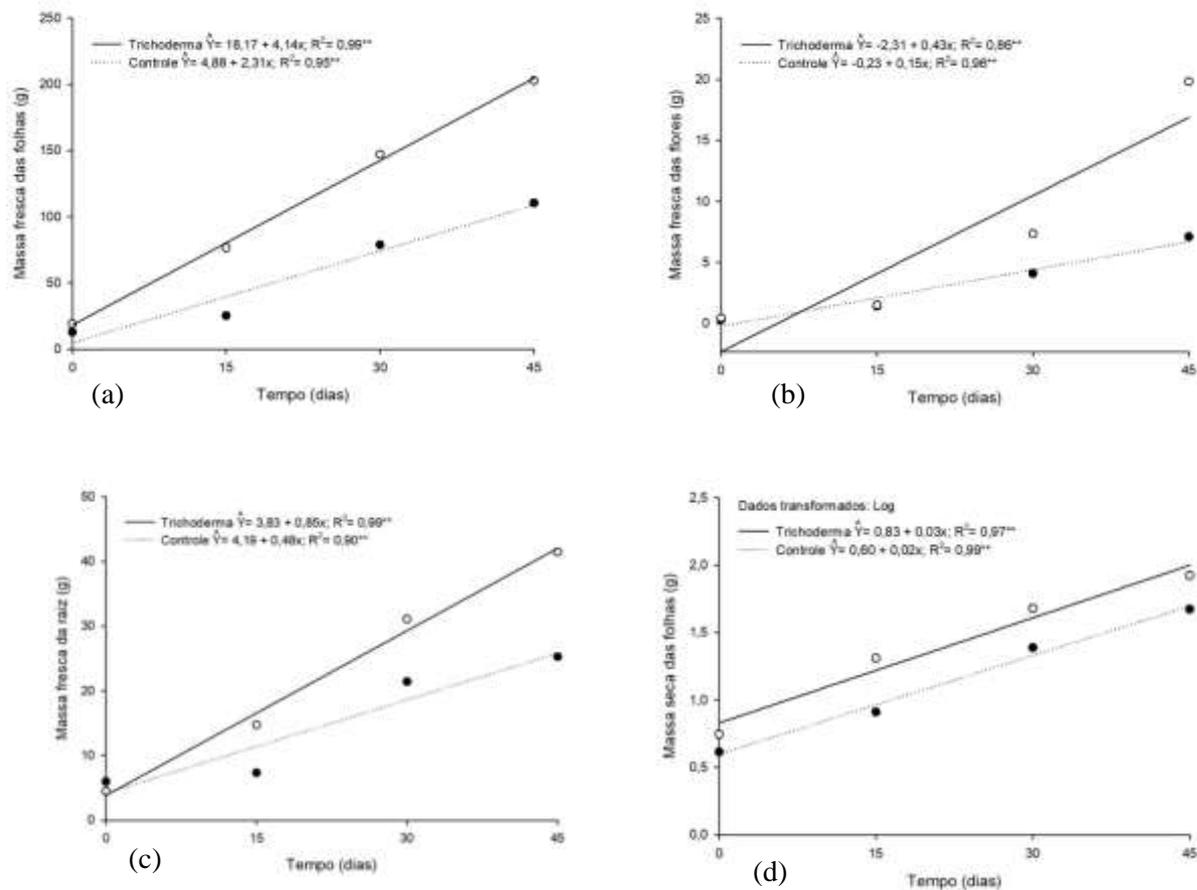


Figura 2: Massa fresca das folhas (a), Massa fresca das flores (b), Massa fresca da raiz (c), Massa seca das folhas (d) de *Lippia alba*, cultivadas com e sem *Trichoderma* nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias.

O comprimento da raiz das plantas que não foram cultivadas com *Trichoderma* não apresentaram diferenças significativas em função do tempo de análise (**Figura 3**).

Na ALT das plantas cultivadas com *Trichoderma*, o incremento proporcionado aos 45 dias, em relação ao tempo 0, foi de 14,23%. Para NH, NF, NI, MFF, MFR, MFI, MSR, MSF e MSI o incremento foi de 42,6%, 45,6%, 63,5%, 45,6%, 39%, 64%, 38,4%, 44% e 58,3%, respectivamente.

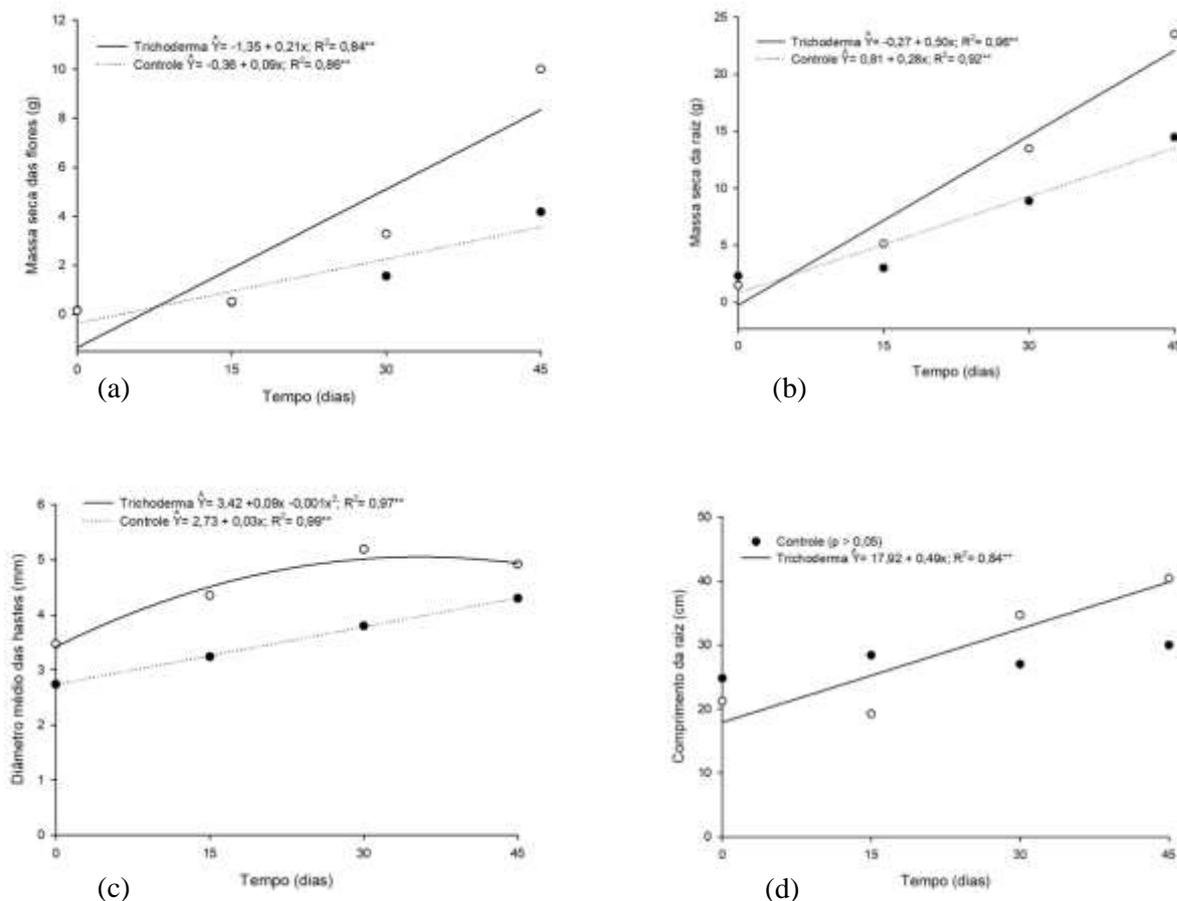


Figura 3: Massa seca das folhas (a), Massa seca da raiz (b), Diâmetro médio das hastes (c), Comprimento de raiz (d) de *Lippia alba*, cultivadas com e sem *Trichoderma* nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias.

Com relação a produção de metabólitos especiais em função do tempo de análise (**Figura 4**), o modelo que melhor se ajustou para o teor de óleo essencial das plantas cultivadas com *Trichoderma* foi o linear crescente, onde é possível observar que com o passar dos dias há o aumento do teor. Já para as plantas controle, o melhor modelo foi o linear quadrático, onde aos 19 dias houve um aumento da produção estimada de óleo essencial seguido de uma redução na produção desse metabólito.

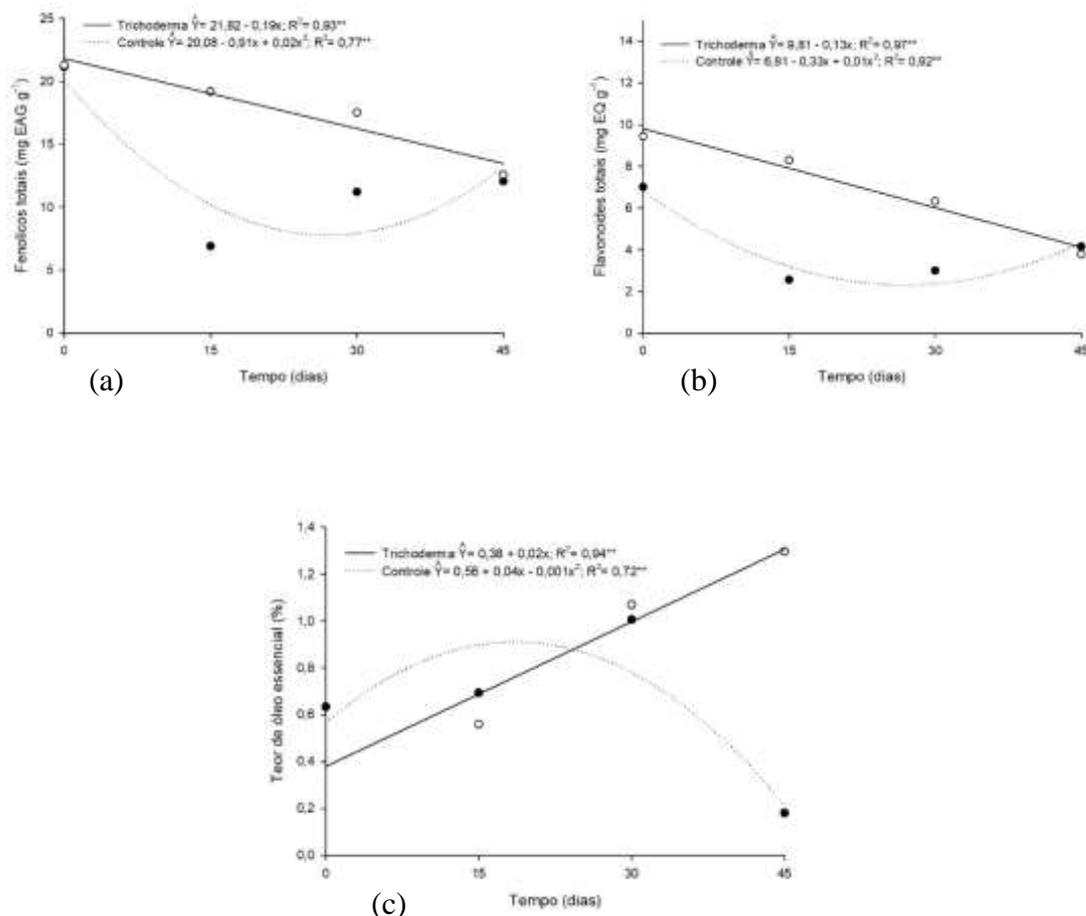


Figura 4: Fenólicos totais (a), Flavonoides totais (b) e teor de óleo essencial (c) de *Lippia alba*, cultivadas com e sem *Trichoderma* nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias.

Para os fenólicos totais e flavonoides a curva foi inversamente proporcional a do teor de óleo essencial, onde, para as plantas cultivadas com *Trichoderma*, o modelo linear decrescente foi o que melhor se ajustou aos dados. Em resumo, com o passar dos dias houve uma redução da biossíntese desses compostos. Para as plantas sem o *Trichoderma*, o modelo quadrático foi o melhor, onde é possível observar que até os 25 dias houve uma redução da produção desses compostos e após isso, ocorre o aumento da mesma.

Esses resultados indicam que quando a planta de *Lippia alba* redirecionou a sua rota metabólica para produção de óleo essencial, ela reduziu a biossíntese dos compostos fenólicos, e vice-versa. Vale ressaltar que a idade e a fase de desenvolvimento, assim como os diferentes órgãos vegetais também são de grande importância e podem influenciar na produção dos metabolitos e também na sua composição. Comumente observa-se que em tecidos mais jovens a biossíntese de metabolitos especiais é maior, mas também pode ocorrer o inverso, um decréscimo na produção dos metabolitos

especiais, destacando os compostos fenólicos, nos períodos em que há um rápido crescimento tecidual (GLOBBO-NETO, LOPES, 2007).

Com base nesses resultados, o momento propício para colheita, visando um maior teor de óleo essencial, seria aos 45 dias, realizando três aplicações da suspensão de *Trichoderma*. Já, visando a produção de compostos fenólicos e flavonoides, o período ideal seria anterior aos 45 dias, entre 15 e 30 dias, onde a planta teria uma biomassa considerável, já que a mesma precisa ser suficiente para extração desses fitoquímicos.

4. Conclusão

Utilizar o *Trichoderma* na produção de plantas de *Lippia alba* favorece o acúmulo de biomassa e aumenta a produção, principalmente o teor de óleo essencial, obtendo o seu maior rendimento aos 45 dias, sendo esse, o melhor período de colheita das plantas.

5. Referências bibliográficas

CARDOSO, J.C., OLIVEIRA DE, M.E.B., CARDOSO, F., DE, C. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Hortic. Bras.**37, 2019.

CASTILHO, V.V.C, LEITAO G. S., SILVA, D.V., MIRANDA, O.C, SANTOS. C. S.M., BIZZO, R. H., SILVA, C.B. N., In vitro propagation of a carvacrol-producing type of *Lippia origanoides* Kunth: A promising oregano-like herb, **Industrial Crops and Products**, 2019.

CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017.

GLOBBO-NETO, L., LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores De Influência No Conteúdo De Metabólitos Secundários. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, p.374-381, 2007.

JESUS, V. F. *Lippia alba* (Mill) N. Brown ASSOCIADA ao *Trichoderma* spp.: BIOMASSA, ÓLEO ESSENCIAL E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das almas, 2020.

LÓPEZ, A. C. et al. *Trichoderma* spp. from Misiones, Argentina: effective fungi to promote plant growth of the regional crop *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Mycology**, v. 10, n. 4, p. 210-221, 2019.

MARTINS, E.R. **Plantas medicinais**. 2. ed. Viçosa: UFV – Imprensa Universitária, 220p. 1998.

MENEZES E.L.A. Controle biológico: na busca pela sustentabilidade da agricultura brasileira. **Campo e negócios**. Uberlândia. 2006

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, p. 517–522, 2012.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. *Trichoderma*: Uso na agricultura. **EMBRAPA**. 538 p. Brasília, 2019.

MOREIRA, G. C. et al. Support vector machine and PCA for the exploratory analysis of *Salvia officinalis* samples treated with growth regulators based in the agronomic parameters and multielement composition. **Food Chemistry**, 2022.

OLIVEIRA, D.R., LEITÃO, G.G., FERNANDES, P.D., LEITÃO, S.G., 2014. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. **Rev. Bras. Farmacogn.** 24, 206–214

PASCALE, A. et al. *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. **Crop protection**, v. 92, p. 176-181, 2017.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL < <https://www.R-project.org/> >

SANTOS, A. S.; ALVES, S. de M.; BAKER, D.; ROCHA NETO, O. **Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 6p. 2004

STEWART, A., HILL, R. Chapter 31 - Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. Biotechnology and Biology of *Trichoderma*, **Elsevier**, 2014.

ZAPATA-SARMIENTO, D. H. et al. *Trichoderma asperellum*, a potential biological control agent of *Stemphylium vesicarium*, on onion (*Allium cepa* L.). **Biological Control**, v. 140, p. 104105, 2020.

ZOTTI-SPEROTTO, C. N. et al. Intermittent drying of *Lippia origanoides* H.B.K. leaves and *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits, **Industrial Crops and Products**, Volume 161, 2021.

WINK, M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines** **2**, 2015.

