

**MICROPROPAGAÇÃO E TEOR DE ÓLEO
ESSENCIAL *IN VITRO* DE *Melissa officinalis* L.**

ÉRIKA SOARES REIS

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ÉRIKA SOARES REIS

**MICROPROPAGAÇÃO E TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL *IN VITRO* DE
Melissa officinalis L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Ph.D José Eduardo Brasil Pereira Pinto

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Reis, Érika Soares

Micropropagação e teor de óleo essencial *in vitro* de *Melissa officinalis* L. / Érika Soares Reis. – Lavras: UFLA, 2007.

58 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Melissa officinalis* L. 2. Planta medicinal. 3. Germinação *in vitro*.

4. Cultura de tecidos. 5. Micropropagação. 6. Óleo essencial.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.88387

ÉRIKA SOARES REIS

**MICROPROPAGAÇÃO E TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL *IN VITRO* DE
Melissa officinalis L**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 14 de fevereiro de 2007

Profa. Dra. Ana Valéria de Souza - UEL

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães - UFLA

**Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, paciência, força e sabedoria.

Aos meus pais, Osvaldo Reis e Nilza Soares Reis, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos, sendo grandes exemplos de dignidade e perseverança.

Ao meu esposo, Ricardo, pelo apoio, incentivo, paciência e ajuda em todos os momentos.

Ao prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelo apoio, confiança, amizade, orientação e companheirismo, desde a graduação.

Aos professores Profa. Dr. Ana Valéria de Souza e Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães, pela participação na banca.

Ao prof. Pedro Henrique Ferri (Instituto de Química da UFG), pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, na realização das análises químicas do óleo essencial.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Luciana Rosado pela ajuda no decorrer de todo este trabalho e também às estagiárias Aline, Andréia e Caroline.

Aos técnicos Evaldo, Wantuil e Claret e aos servidores técnicos do Horto de Plantas Mediciniais, Sr. Geraldo Luiz e Sr. Luiz Gonzaga, pela colaboração, apoio e amizade durante a condução dos trabalhos de pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Mediciniais: Flávia, Júlio, Rita, Louise, Juliana, Fabiano, Helen, Priscila, Jorge, Renata, Roseane, Larissa e Sandra, pela amizade.

Aos meus grandes amigos e amigas: Ronaldo Libânio, Ana Valéria, Janine, Dili, Claudinéia, Luciana Souza, Luciano, Flávia Costa, Flávia Carvalho Mariana, Luciano Veiga e Patrícia e a tantos outros, pela força e amizade.

À Universidade Federal de Lavras, pelo curso de graduação e ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Enfim, a todos que contribuíram de forma positiva para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO I	1
MEIOS DE CULTURA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS <i>IN VITRO</i> E TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DE <i>MELISSA OFFICINALIS L.</i>	1
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
MATERIAL E MÉTODOS	6
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO II.....	28
MICROPROPAGAÇÃO DE <i>MELISSA OFFICINALIS L.</i> , EM FUNÇÃO DE VOLUMES DE MEIO DE CULTURA E POSIÇÃO DO EXPLANTE.....	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	32

RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO III	45
TEOR E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>MELISSA OFFICINALIS</i> L. IN <i>VITRO</i>, SOB A INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA	45
RESUMO	45
ABSTRACT	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMO GERAL

REIS, Érika Soares. **Micropropagação e Teor de Óleo Essencial *in vitro* de *Melissa officinalis* L.** 2007. 58 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) . – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.¹

Com o objetivo de estabelecer o protocolo de micropropagação e estudar o teor de óleo essencial *in vitro* de *Melissa officinalis*, realizou-se cinco experimentos: 1) efeito do meio de cultura e sacarose na germinação de sementes *in vitro*; 2) meios de cultivo na multiplicação *in vitro*; 3) volumes de meio de cultura na micropropagação de melissa, 4) tipo de explante no cultivo *in vitro* e 5) influência do meio de cultura na produção e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis*. Constatou-se que o meio MS/4 proporcionou maior índice de velocidade de germinação e maior porcentagem de germinação. Para o comprimento da parte aérea, foi observado que o meio MS produziu melhores resultados. No experimento de taxa de multiplicação, observou-se que plântulas de *M. officinalis* subcultivadas em meio MS contendo 4,44 µM de BAP apresentaram um maior número de brotos, mas, com um pequeno número de nós e comprimento de broto. Não houve formação de raízes. Maior taxa de multiplicação foi obtida em plântulas cultivadas em meio MS. O volume de meio influenciou significativamente o número de nós e o comprimento da maior brotação. Com relação ao tipo de explante, observou-se que os segmentos nodais obtidos das posições mediana e basal produziram um maior número de brotos e o segmento apical produziu brotos com maior número de nós e maior comprimento. No experimento com óleo essencial, as plântulas cultivadas em meio MS e MS/4 apresentaram um maior teor de óleo essencial, sendo identificados os componentes majoritários: geranial (25,23% e 16,21%, respectivamente) e o neral (24,5% e 20,53%, respectivamente). Já o componente majoritário presente no óleo de plântulas de *Melissa officinalis* cultivadas em meio MS/2 foi o acetato de nerila (18,69%).

¹ Orientador: PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA

GENERAL ABSTRACT

REIS, Érika Soares. **Micropropagation and Essential Oil Content *in vitro* of *Melissa officinalis* L.** 2007. 58 p. Dissertation (Master in Agronomy/Crop Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil¹.

With the objective of studying the Micropropagation and Essential Oil Content *in vitro* of *Melissa officinalis* five experiments were carried out: 1) effect of the culture medium and sucrose in seeds germination *in vitro*; 2) culture medium in the multiplication *in vitro*; 3) volumes of culture medium of *Melissa officinalis* micropropagation; 4) explante type in the culture *in vitro* and 5) influence of the culture medium in the production and chemical composition of the essential oil of *Melissa officinalis*. It was verified that MS/4 medium provided larger index of germination speed and larger germination percentage, and for the length of the aerial part it was observed that MS medium produced better results. In the experiment of multiplication rate it was observed that plantlets of *M. officinalis* cultivate in MS medium containing 4,44 µM of BAP presented a larger number of shoot, but with small number of nodes and shoot length. Having no roots formation. Larger multiplication rate was obtained in cultivated plants in MS medium. Medium volume influenced significantly the number of nodes and the length of the largest shoot. With relationship to the explante type was observed that the nodal segments obtained from medium and basal positions produced a larger number of shoots and apical segment produced shoots with larger number of nodes and larger length. In the experiment of essential oil, the plantlets grown in the MS and MS/4 medium presented a larger tenor of essential oil, being identified the majority components: geranial (25,23% and 16,21%, respectively) and neral (24,5% and 20,53%, respectively), out the major component present in the oil of *M. officinalis* plants cultivated in MS/2 medium was nerila acetate (18,69%).

¹ Guidance: Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA

CAPÍTULO I

Meios de cultura na germinação de sementes no desenvolvimento de plântulas *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a germinação *in vitro* de sementes de *Melissa officinalis* e sua taxa de multiplicação, foi implantado o presente trabalho. Diferentes concentrações de sacarose (3% e 1,5%) e dos sais do meio MS (MS, MS/2 e MS/4) foram testadas para a germinação das sementes. A taxa de multiplicação foi avaliada em plântulas presentes em meio MS e MS acrescido de 4,44 μM de BAP. Os experimentos foram implantados em delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro com 6 repetições, onde cada repetição foi composta por 5 tubos contendo 6 sementes por tubo. O segundo com 11 repetições e cada parcela composta por 4 tubos de ensaio. No primeiro experimento, avaliaram-se o IVG, a porcentagem de germinação e o comprimento do maior broto e, no segundo experimento, o número de brotos, o número de nós, o comprimento do maior broto e o número de raízes principais. O meio MS/4 proporcionou maior índice de velocidade de germinação e maior porcentagem de germinação; já para o comprimento da parte aérea, observou-se que, no meio MS, as plântulas apresentaram um maior comprimento. No segundo experimento, observou-se que plântulas de *M. officinalis* subcultivadas em meio MS contendo 4,44 μM de BAP apresentaram um maior número de brotos, mas com um pequeno número de nós e comprimento de broto, não havendo também formação de raízes. A maior taxa de multiplicação foi obtida em meio MS.

Palavras-chave: *Melissa officinalis*, planta medicinal, cultura de tecidos.

ABSTRACT

Culture medium in the seed germination in development of plantlets *in vitro* and multiplication rate of *Melissa officinalis* L.

With the objective to evaluate the seed germination *in vitro* of *Melissa officinalis* and multiplication rate, the present work was carried out. Different sucrose (3% and 1,5%) and salt concentration of MS medium (MS, MS/2 and MS/4) were tested for seed germination. The multiplication rate was evaluated in MS medium and in MS supplemented with 4,44 μM of BAP. The experiments were in completely randomized design, being the first with 6 replications and the second with 11 replications with for 4 tubes. In the first experiment it was evaluated GVI (germination velocity index), the seed germination percentage and the shoot length, and in the second experiment were evaluated shoot number, nodal number, shoot length and root number. The MS/4 medium provided larger germination velocity index and larger germination percentage, however for the shoot length it was observed in the MS medium. In the second experiment it was observed that shoots of *M. officinalis* cultivate in MS medium containing 4,44 μM of BAP presented a larger shoot number, but with a small number of nodes and shoot length, also having no roots formation. The larger multiplication rate was obtained in MS medium.

Key words: *Melissa officinalis* L., medicinal plant, tissue culture.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais pela população mundial nos últimos tempos. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% se dá por indicação médica (Martins et al., 1998).

As Lamiaceae compreendem uma família pertencente à Ordem Tubiflorae (Lamiales), abrangendo cerca de 200 gêneros e, aproximadamente, 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo. Pertencente a esta família, *Melissa officinalis*, conhecida popularmente como melissa ou erva cidreira, é uma planta aromática, herbácea, perene, com caule quadrangular e folhas opostas. Possui aplicações na medicina, culinária (condimento) e perfumaria (constituintes aromáticos). A infusão das folhas é usada como sedativo e tem propriedades antiespasmódicas, antinevrálgica e carminativa. (Morelli, 1977).

Devido a grande busca da população pelo uso de produtos naturais, o mercado de plantas medicinais está em constante ascensão, para dar um maior impulso neste crescimento está havendo um incentivo do uso da fitoterapia pelo SUS, sendo que já foi aprovado pelo Conselho Nacional de Saúde em 15 de dezembro de 2005 a inserção das Plantas Medicinais e da Fitoterapia no SUS.

Assim, é necessário o estudo de métodos para se otimizar a produção de plantas medicinais e isso é obtido através da pesquisa com essas plantas, estudando o seu desenvolvimento e em quais condições de terminada planta se desenvolve melhor.

A cultura de tecidos vem sendo uma técnica amplamente utilizada como ferramenta biotecnológica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades medicinais, tais

como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial.

Mercier & Nievola (2003) consideram que a germinação de sementes *in vitro* é uma ótima opção para se conseguir plantas assépticas e a partir delas se iniciar a cultura de explantes, como folhas, segmentos nodais entre outras.

Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies. No entanto, o sucesso deste processo depende de alguns fatores, como o genótipo, o regulador de crescimento e sua dosagem, o meio de cultivo, concentrações de sacarose e as condições de incubação, dentre outros.

Estudando a germinação *in vitro* de cubiu (*Solanum sesseliflorum*), Jurack et al. (2003) observaram, para a variedade Santa Luzia, maior porcentagem de germinação em meio MS/2. Já para a variedade Thaís maior porcentagem de germinação ocorreu em meio MS completo.

Segundo Grattapaglia & Machado (1990), as plantas cultivadas *in vitro* requerem fonte de energia exógena, pois não dispõem de condições adequadas para a realização da fotossíntese. Diante disso, a sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada, estando presente em meios de cultura em concentrações que variam de 20 a 40 g.L⁻¹ (Ferreira et al., 2002). Portanto, variações na concentração deste carboidrato no meio de cultivo afetam as condições osmóticas e o metabolismo da planta *in vitro*, influenciando no crescimento e no metabolismo das culturas (Kumar et al., 1984; Ozaias-Akins & Vasil, 1982).

Em pesquisas de Pereira (2006), para a espécie *Astrocaryum uelei*, concentrações de sacarose acima de 1,5 % inibiram a germinação de embriões desta espécie.

Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que o tipo e a concentração utilizados de citocinina são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*, sendo a faixa mais empregada entre 2,22 e 22,2 µM. O excesso pode ser tóxico e comprometer o desenvolvimento das culturas.

Em pesquisas de Oliveira e Silva (1997) relativas à micropropagação de banana (*Musa sp.*), o meio ideal foi o MS suplementado com 17,76 µM de BAP, no que foram obtidas taxas de multiplicação de 2,1 para a cultivar Nanicão e 2,4 para a cultivar Grande Naine.

Deschamps (1993) observou em brotações de sarandi (*Sebastiania schottiana*) um maior desenvolvimento em meio WPM sem reguladores de crescimento e que a adição de BAP foi responsável pela redução do número de folhas por explante e também pela redução do comprimento das brotações. Embora o BAP seja utilizado na maioria dos sistemas experimentais *in vitro*, verifica-se diferentes sensibilidades das culturas a essa citocinina, dependendo do meio de cultura utilizado e da fase de cultivo.

Como o objetivo do trabalho é maximizar a produção *in vitro* de *Melissa officinalis*, estudou-se o efeito do meio de cultura e sacarose no desenvolvimento inicial de plântulas, bem como se avaliou meios de cultivo na multiplicação de *Melissa officinalis* L. *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento I: Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Melissa officinalis* L.

A) Local de condução do ensaio e assepsia das sementes

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas sementes de *Melissa officinalis* coletadas em 2005. Inicialmente, estas sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 0,8%, por 20 minutos e posteriormente foram levadas para a câmara de fluxo laminar e lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada.

B) Inoculação das sementes

Após a realização do processo de assepsia, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 12 ml de meio de cultura, sendo inoculadas seis sementes por tubo.

O meio de cultura utilizado constituiu do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com diferentes concentrações de sacarose de acordo com os seguintes tratamentos: T1) 100% dos sais do MS + 3% de sacarose; T2) 50% dos sais do MS + 3% de sacarose; T3) 25% dos sais do MS + 3% de sacarose; T4) 100% dos sais do MS + 1,5% de sacarose; T5) 50% dos sais do MS + 1,5% de sacarose e T6) 25% dos sais do MS + 1,5% de sacarose.

Os meios de cultura foram solidificados com 0,6% de ágar, tendo o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e, em seguida, autoclavado, a 120°C e 1 atm, por 20 minutos.

Os tubos inoculados com as sementes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

C) Avaliações

As avaliações foram iniciadas no primeiro dia em que as sementes começaram a germinar (protrusão da radícula) sendo esta ocorrência observada aos 3 dias após a inoculação. As protrusões foram contadas por sete dias seguidos para o cálculo do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (Maguire, 1962) e a porcentagem de germinação depois dos sete dias, calculada com base no número de plântulas normais (Brasil, 1992). Após 30 dias foi avaliado o comprimento da parte aérea das plântulas germinadas.

D) Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3x2), com três concentrações do meio MS e duas concentrações de sacarose, com 6 repetições. Cada parcela experimental foi composta por 5 tubos e 6 sementes por tubo.

A análise de variância foi realizada utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2000) e as médias comparadas por meio do Teste de Skott & Knott.

Experimento II: Multiplicação *in vitro* e aclimatização de *Melissa officinalis* L.

A) Fonte de explantes e multiplicação *in vitro*

Plântulas germinadas *in vitro* foram doadoras de segmentos nodais, utilizados com explantes para o presente experimento. Os tratamentos consistiram do meio MS com presença ou ausência de regulador de crescimento (BAP-benzilaminopurina), ou seja, T1) MS sem BAP e T2) MS suplementado com 4,44 μM de BAP.

Os meios de cultura utilizados foram solidificados com 0,6% de ágar, suplementado com 3% de sacarose e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, sendo utilizados tubos de ensaio de 75 x 25 mm, contendo 12 mL de meio por tubo. Em seguida, os meios foram autoclavados, á 120° C e 1 atm de pressão, por 20 minutos.

A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, colocando-se 1 segmento nodal por tubo.

Em seguida, os tubos contendo os explantes foram levados para sala de crescimento e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de 26 ± 1 °C.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 11 repetições e cada parcela experimental composta por 4 tubos de ensaio.

O estudo da taxa de multiplicação *in vitro* de *M. officinalis* foi feito realizando-se 3 subcultivos das plântulas com intervalos de 30 dias entre cada subcultivo para os tratamentos 1 e 2 separadamente. Para cada subcultivo, foi utilizado o mesmo delineamento experimental (DIC) contendo o mesmo número de repetições (11) e plântulas por parcela (4). As avaliações foram feitas no final de cada subcultivo (30 dias), quando foram analisados número de brotos, número de nós, comprimento do maior broto e número de raízes principais.

Das plântulas obtidas no primeiro subcultivo (Tratamento 1), após avaliadas, foram retirados explantes (segmentos nodais) para o segundo subcultivo. Após a avaliação deste, as plântulas obtidas serviram como fonte de explante para o terceiro subcultivo.

Com a formação de múltiplos brotos no meio MS com 4,44 μ M BAP (Tratamento 2), as múltiplas brotações foram individualizadas e utilizadas como explantes para os subcultivos seguintes, tendo o meio MS com 4,44 μ M de BAP sido usado em todas as 3 multiplicações.

De posse das avaliações de crescimento dos Tratamentos 1 e 2, foi estimado, por inferência, o número de plântulas obtidas a partir de um único explante ao final dos seis subcultivos.

C) Aclimatização

Plântulas micropropagadas e microestacas oriundas de subcultivos em meio MS sem BAP (Tratamento 1) e meio MS com BAP (Tratamento 2), respectivamente, foram transplantadas para bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax®. As bandejas foram colocadas em casa de vegetação para o processo de aclimatização, sendo este processo feito reduzindo-se gradativamente a irrigação e aumentando-se a luminosidade.

As plântulas subcultivadas em meio MS apresentavam-se antes do transplântio com raízes e parte aérea, com altura média aproximada de 5 cm. Porém, as plântulas subcultivadas em meio MS com BAP apresentaram-se pequenas (cerca de 1 cm, em média) e sem raízes, sendo consideradas como microestacas.

Foram feitas observações diariamente, analisando-se a percentagem de sobrevivência das plântulas.

Após 10 dias de aclimatização em bandejas, as mudas foram transplantadas para vasos de 3 litros contendo o mesmo substrato Plantmax®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Germinação *in vitro* de *Melissa officinalis* L.

A concentração dos sais do meio MS e a porcentagem de sacarose influenciaram significativamente na germinação de sementes e comprimento da parte aérea de *M. officinalis* ($p \leq 0,05$). Não houve efeito de interação entre os tipos de meio e concentrações de sacarose para todas as variáveis estudadas.

Para o índice de velocidade de germinação, observou-se que o meio MS/4 proporcionou melhor resposta, seguido do meio MS/2, tendo o meio MS sido o que apresentou menor índice de velocidade de germinação (Figura 1).

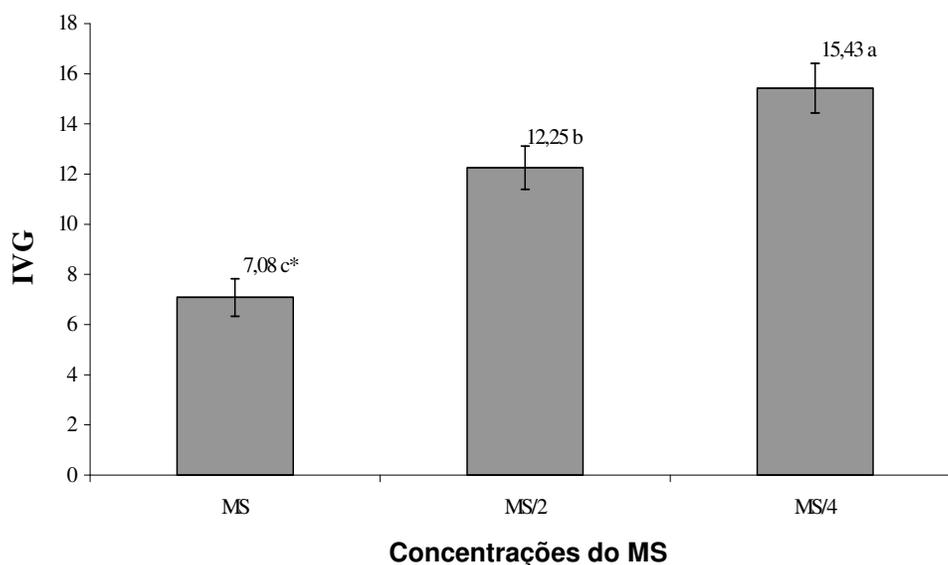


FIGURA 1: Índice de velocidade de germinação de *Melissa officinalis* L., em função de tipos de meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2007.

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

As barras indicam o erro padrão de cada tratamento.

Resultado semelhante foi observado para a variável porcentagem de germinação, em que um maior número de sementes germinadas (64,75 %) ocorreu no meio MS/4 (Figura 2) e a menor porcentagem de germinação no meio MS (37%), sendo estes tratamentos diferentes entre si estatisticamente.

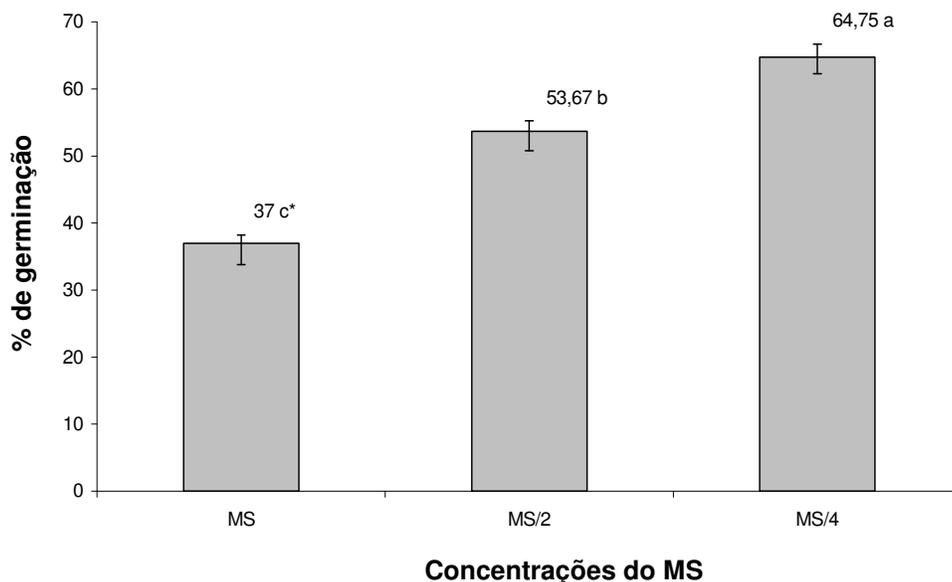


FIGURA 2: Porcentagem de germinação de sementes de *Melissa officinalis* L., em função de tipos de meio de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2007.

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

As barras indicam o erro padrão de cada tratamento.

Para o comprimento da parte aérea, observou-se que, no meio MS, as plântulas apresentaram melhor resposta (8,86 cm), seguido do meio MS/2 (4,5 cm). No meio MS/4, as plântulas apresentaram com menor comprimento de parte aérea (2,5 cm) (Figura 3).

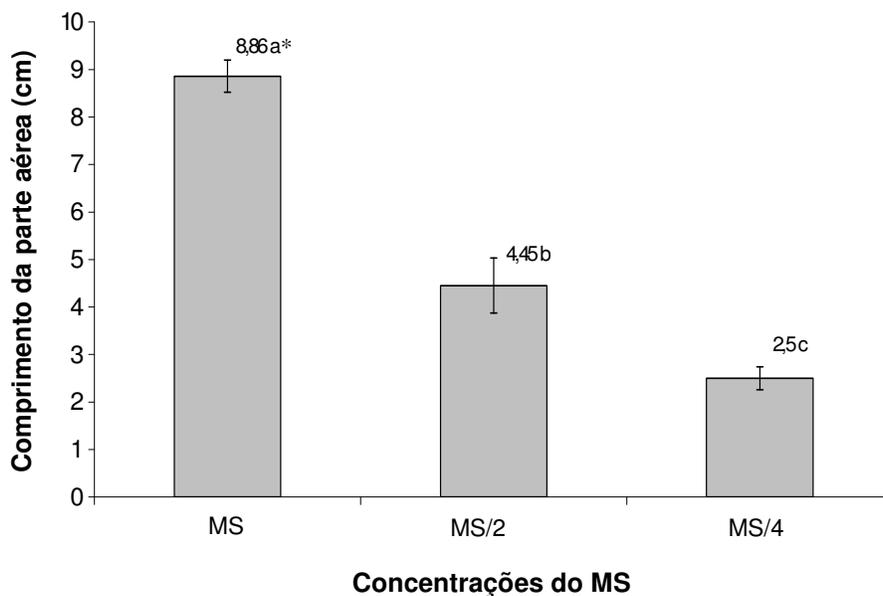


FIGURA 3: Comprimento de parte aérea de plântulas germinadas de sementes de *Melissa officinalis* L., em função de tipos de meio de cultura. UFLA, Lavras-MG, 2007.

*As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

As barras indicam o erro padrão de cada tratamento

A presença de uma maior concentração de sais, possivelmente, interferiu no potencial hídrico do meio de cultura e, reduziu a disponibilidade de água para o processo de embebição da semente na germinação.

Com relação ao efeito da sacarose, independente do tipo de meio, pôde-se observar que a concentração de 1,5% proporcionou melhores resultados para as três variáveis analisadas (Tabela 1).

TABELA 1: Índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de germinação (%) e comprimento da parte aérea de *Melissa officinalis*, em função de concentrações de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2007.

Concentrações de sacarose (%)	Valores médios		
	IVG	% de germinação	Comprimento da parte aérea (cm)
1,5	13,30 a*	57,78 a	6,38 a
3,0	9,87 b	45,84 b	4,16 b

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de F, a 5 % de probabilidade.

Tais constatações, provavelmente, se devem ao fato de que a semente já possui, em sua reserva nutritiva, teor de sacarose que lhe permita a emissão da plúmula e da radícula. Adicionalmente, o excesso de sacarose colocado no meio extracelular pode ter provocado maior dificuldade de absorção de água, devido à pressão osmótica exercida sobre a semente.

Segundo George (1996) a diminuição da porcentagem de germinação com o aumento da concentração de sacarose é decorrente da regulação osmótica do meio de cultura, visto que concentrações elevadas de sacarose fazem com que o meio de cultura não tenha água disponível para a embebição das sementes, impossibilitando o início do processo de germinação. Esse fato explica os menores valores de IVG e porcentagem de germinação no meio contendo maior concentração de açúcar.

O mesmo pôde ser observado para a concentração de sais do meio, em que o meio com menores concentrações proporcionou maiores taxas de germinação. Por outro lado, concentrações superiores de nutriente no meio, embora possam reduzir a germinação, produzem plântulas maiores, mais

vigorosas, aumentando a reserva dos tecidos, o que é importante para as etapas iniciais de aclimatização.

Resultados semelhantes ao do presente trabalho foram encontrados por Souza et al. (2003) que, estudando a germinação *in vitro* de embriões de *Lychnophora pinaster*, observou que o meio MS, por conter elevadas concentrações de nutrientes, inibiu a germinação de embriões desta espécie, ao passo que os meios com menores concentrações salinas (WPM e MS/4) proporcionaram maiores taxas de germinação.

Já Naves (2001), estudando a propagação *in vitro* de bromélia imperial e avaliando a germinação de sementes utilizando meio MS em diferentes concentrações (0%, 25%, 50%, 75%, 100% e 125%), observou uma maior velocidade de germinação e porcentagem de germinação nas sementes presentes nos meios com concentrações superiores a 75% do MS, tendo o mesmo sido observado para a altura final das plântulas.

Assim, é importante conhecer os fatores que afetam a germinação de sementes de cada espécie, para se obter sucesso no processo de estabelecimento de plântulas *in vitro*.

Experimento II: Multiplicação *in vitro* e aclimatização de *Melissa officinalis* L

O meio de cultura influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) na taxa de multiplicação de *Melissa officinalis*, para todas as variáveis analisadas.

Para a variável número de brotos, no primeiro subcultivo, não houve diferença no número médio de brotos para as plântulas presentes no meio MS e no meio MS + 4,44 μ M de BAP. Já no segundo e terceiro subcultivos, as plântulas presentes no meio com BAP apresentaram um número médio de brotos

significativamente maior que as plântulas presentes no meio MS sem a presença de BAP (Tabela 2).

TABELA 2: Número médio de brotos de *Melissa officinalis*, em função do meio de cultura nos três subcultivos. UFLA, Lavras-MG, 2007.

Tratamentos	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo
MS	1,91 a	1,59 b	2 b
MS + BAP	1,98 a	3,25 a	3,7 a

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de F ao nível de 5 % de probabilidade.

Hu & Wang (1983) afirmam que as citocininas são utilizadas para quebrar a dominância apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação. Desse modo, ocorre um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais. Esse relato corrobora com os resultados obtidos para a espécie em estudo.

Pesquisas de Erig et al. (2002), ao estudarem a ação de 6-benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta, mostraram que as concentrações de 2 e 4 μM de BAP foram responsáveis pelo maior número de brotações.

Com relação ao número de nós, observou-se que, para os três subcultivos, as plântulas presentes no meio MS sem a presença de BAP apresentaram um número de nós maior (média de 3,8 nós) que as plântulas presentes no meio com a presença de 4,44 μM de BAP (média de 2,5 nós) para os três subcultivos), conforme mostrado na Tabela 3.

TABELA 3: Número médio de nós de *Melissa officinalis*, em função do meio de cultura nos três subcultivos. UFLA, Lavras-MG, 2007.

Tratamentos	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo
MS	3,54 a	3,42 a	4,6 a
MS + BAP	1,06 b	2,73 b	3,6 b

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de F ao nível de 5 % de probabilidade.

A partir desses resultados de número de brotos e número de nós, pode-se calcular a taxa de multiplicação das plântulas presentes no meio sem e com BAP. As plântulas presentes no meio MS sem BAP foram multiplicadas em segmentos nodais a partir do número de nós e nas plântulas presentes no meio MS com a presença de BAP realizou-se a individualização de brotos.

Assim, pode-se estimar, a partir dos valores médios de números de nós para plântulas presentes no meio MS e a partir do número de brotos para plântulas presentes no meio MS + BAP, o número de plântulas obtidas no final de seis meses de cultivo.

Dessa forma, considerando uma média de quatro nós por plântula, para as plântulas presentes no meio MS sem BAP, pode-se obter no final de seis meses de subcultivos, um total de 1.024 plântulas. Já para as plântulas presentes no meio MS com 4,44 μ M de BAP, considerando uma média de três brotos por plântula no final de seis subcultivos (seis meses), obtem-se um total de 486 plântulas (Figuras 4 e 5).

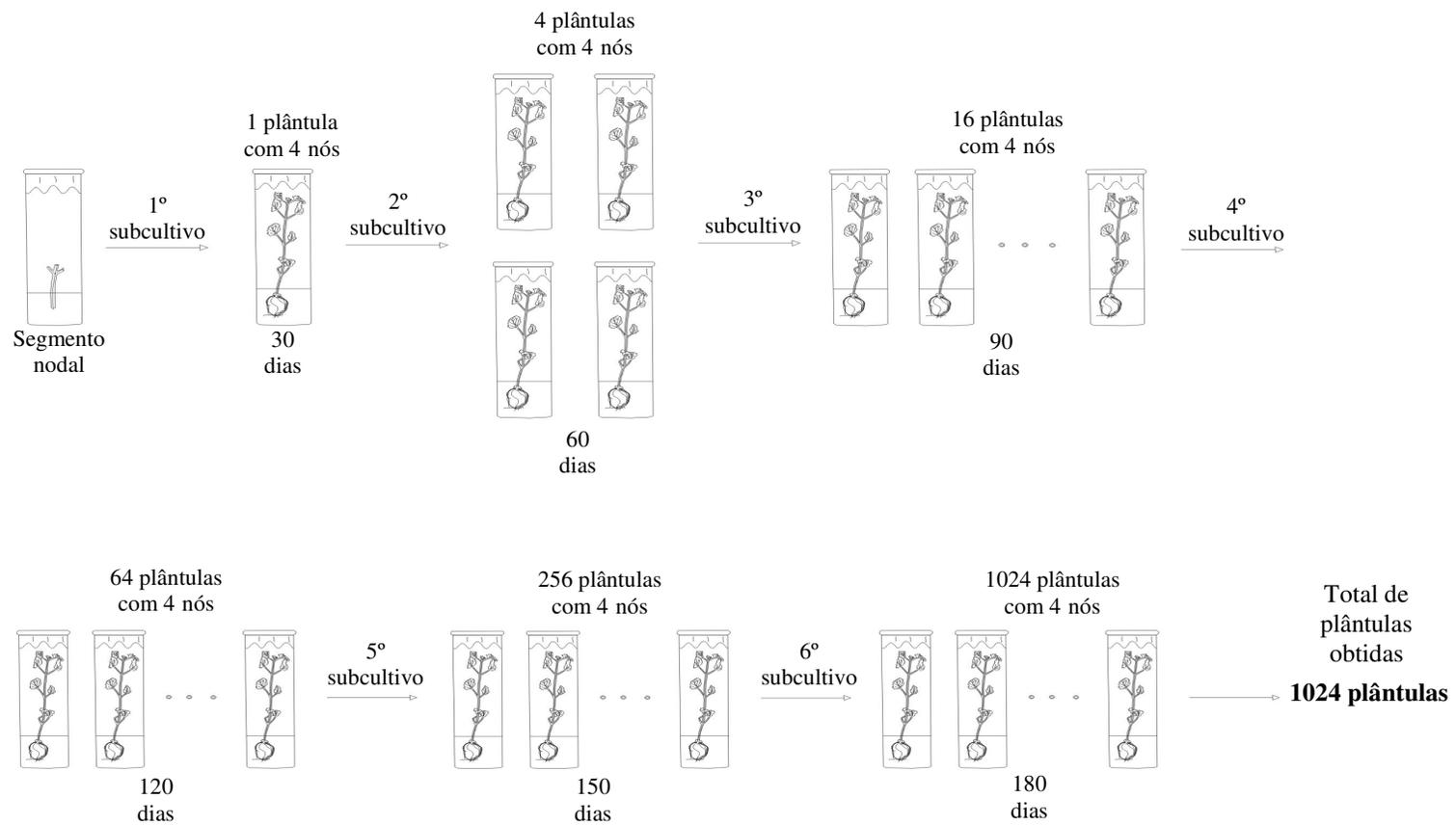


FIGURA 4: Multiplicação *in vitro* de *Melissa officinalis* subcultivada por 6 meses, em meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2007.

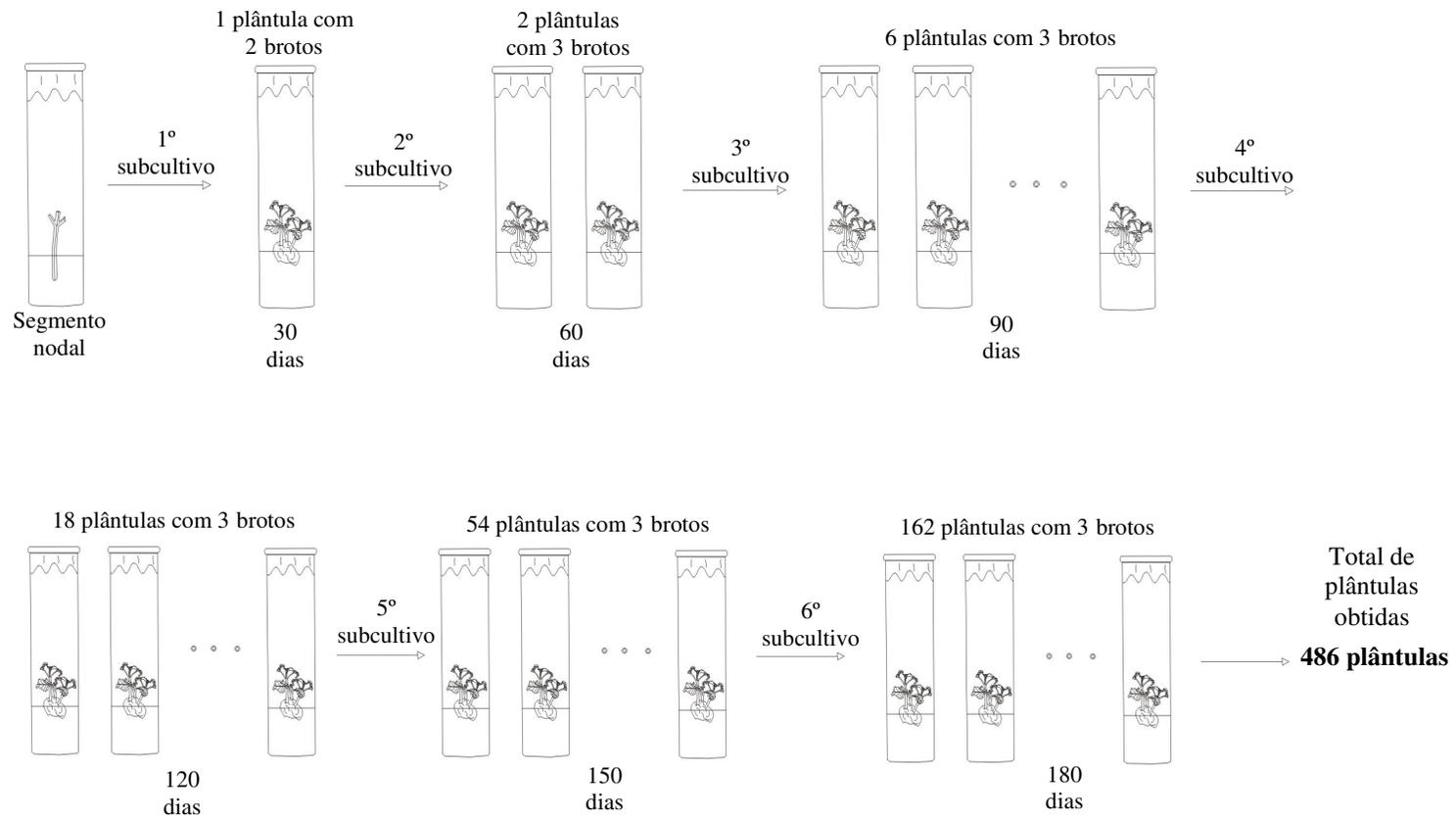


FIGURA 5: Multiplicação *in vitro* de *Melissa officinalis* subcultivada por 6 meses, em meio MS + 4,44 μ M de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2007.

Por esses resultados pode-se observar que a taxa de multiplicação de *M. officinalis* é cerca de 2,1 vezes maior para plântulas subcultivadas em meio MS do que para plântulas subcultivadas em meio MS na presença de BAP.

Este resultado é muito interessante visto que embora a presença de BAP no meio de cultura proporcione a formação de múltiplos brotos, a taxa de multiplicação de melissa é maior na ausência de BAP, sendo um fator muito importante na diminuição de custos na produção comercial de mudas.

Gratapaglia & Machado (1998) afirmam que, embora o principal objetivo a ser alcançado na fase de multiplicação é produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos importantes devem ser considerados. Não basta conseguir altas taxas de multiplicação em alguns explantes, o importante é obter uma taxa média satisfatória com o mínimo de variação de explante para explante.

Para a variável comprimento do maior broto, observou-se também que, para os três subcultivo, nas plântulas presentes no meio MS sem BAP o comprimento de broto foi maior (média de 4,2 cm para os três subcultivos) do que nas plântulas presentes no meio MS com BAP, onde o comprimento médio foi de 1,3 cm (Tabela 4).

TABELA 4: Comprimento médio do maior broto de *Melissa officinalis*, em função do meio de cultura, nos três subcultivos. UFLA, Lavras-MG, 2007.

Tratamentos	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo
MS	3,79 a	4,30 a	4,4 a
MS + BAP	0,81 b	1,33 b	1,8 b

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de F ao nível de 5 % de probabilidade.

Leshem et al. (1988) afirmam que o uso de citocinina estimula maior produção de partes aéreas, mas o seu excesso é tóxico e caracteriza-se,

principalmente, pelo demasiado entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva á sérios problemas na fase de enraizamento, fato este que pode ter ocorrido com a melissa.

Giacobbo et al. (2003), estudando a multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira com diferentes níveis de benzilaminopurina e ácido naftaleno acético (NAA), observaram que dosagens superiores a 0,49 μM de BAP proporcionaram um decréscimo no crescimento das brotações de macieira.

Pasqual & Barros (1992), trabalhando com barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), avaliaram o efeito de combinações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L^{-1}) e NAA (0,0; 0,1 e 1,0 mg L^{-1}) adicionadas a meio MS sobre a proliferação de brotos em segmentos de plantas oriundas de germinação de sementes e mantidas *in vitro* e verificaram que o maior número de brotos maiores que 1 cm (1,21) foi observado na ausência de reguladores de crescimento.

Com relação ao número de raízes, observou-se que as plântulas presentes no meio MS sem BAP formaram em média 2,2 raízes por plântula. Já para as plântulas presentes no meio contendo BAP, não houve a formação de raízes em nenhum dos subcultivos (Tabela 5).

TABELA 5: Número médio de raízes de *Melissa officinalis*, em função do meio de cultura nos três subcultivos. UFLA, Lavras-MG, 2007.

Tratamentos	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo
MS	1,97 a	2,86 a	1,7 a
MS + BAP	0,0 b	0,0 b	0,0 b

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de F ao nível de 5 % de probabilidade.

Na Figura 6, são mostradas plântulas de melissa após o primeiro subcultivo em meio MS sem e com BAP, destacando-se as características analisadas.

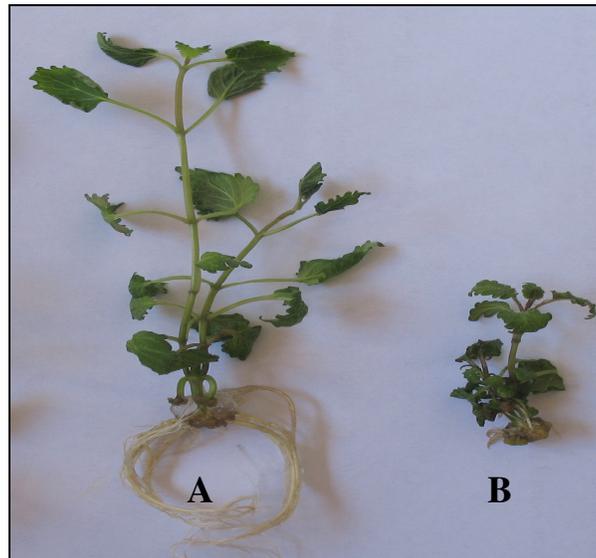


FIGURA 6: Plântulas de *Melissa officinalis* cultivadas *in vitro* com 30 dias. **A)** Plântula cultivada em meio MS sem BAP. **B)** Plântula cultivada em meio MS com 4,44 μ M de BAP (múltiplos brotos). UFLA, Lavras-MG, 2007.

Por esses resultados é possível explicar o que foi observado na etapa de aclimatização. Houve 70% de sobrevivência das plântulas que estavam presentes no meio MS sem a presença de BAP e 0% de sobrevivência das plântulas provenientes de subcultivos em meio MS com 4,44 μ M de BAP (Figura 7). Esse resultado se deve à presença de raízes nas plântulas vindas do cultivo em meio MS e a ausência nas plântulas cultivadas em meio com BAP. Além disso, as plântulas cultivadas em meio MS eram maiores e mais vigorosas.



FIGURA 7: Plantas aclimatizadas de *Melissa officinalis*, subcultivadas em meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2007.

Na Figura 8 são mostradas as plantas provenientes de subcultivos em meio MS e aclimatizadas, sendo cultivadas em vasos de 3 litros contendo substrato comercial Plantmax®, observa-se um perfeito desenvolvimento dessas plantas.



FIGURA 8: Plantas de *Melissa officinalis* com 20 dias de cultivo em vasos. UFLA, Lavras-MG, 2007.

Juliani et al. (1999) estudaram um método de micropropagação do arbusto perene com propriedades medicinais, *Lippia junelliana* (Verbenácea), utilizando brotos apicais e segmentos nodais, inoculando-se os explantes em meio MS completo suplementado com 4,4 µM de BAP ou 0,04 µM de IBA + 4,4 µM de BAP. Estes autores constataram que o enraizamento dos brotos foi maior (100%) em meio MS completo sem regulador de crescimento. Como ocorrido para a espécie em estudo.

Estudando a propagação *in vitro* de *Notacactus magnificus*, Medeiros et al. (2006), utilizando o meio MS suplementado com oito diferentes concentrações de BAP e NAA, observaram que o maior número de brotos ocorreu quando foi suplementado com 22,2 µM de BAP. Costataram também que o enraizamento dos brotos ocorreu na presença de meio MS sem a adição de reguladores e que somente as plântulas enraizadas *in vitro* apresentaram um desenvolvimento normal no cultivo em casa de vegetação.

Assim, é necessário que se faça um estudo do desenvolvimento *in vitro* de cada espécie, partindo da sua germinação, avaliando sua taxa de multiplicação, até sua aclimatização e posterior transplântio para o campo.

CONCLUSÃO

A menor concentração de sais do meio MS e de sacarose proporciona melhores respostas para a germinação *in vitro* de sementes de *Melissa officinalis*.

Maior comprimento de parte aérea é obtido por plântulas inoculadas em meio MS com concentração completa dos sais.

A taxa de multiplicação das plântulas subcultivadas meio MS sem BAP é 2,1 vezes maior do que em plântulas subcultivadas em meio MS com a presença de BAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. MINISTERIO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRARIA.
Regras para análise de sementes. Brasília: MARA, 1992 365 p.
- DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa *in vitro* de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.), espécie florestal de mata ciliar.** 1993. 128 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.
- ERIG, A. C.; ROSSI, A. de; FORTES, G. R. de L. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 765-770, set./out. 2002.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. H. N.; CARVALHO, C. H. S. C.; CARNEIRO, A. A.; DANTAS FILHO, C. F. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 246-248, abr. 2002.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 – the technology.** 2 ed. Edington: Exegetics limited, 1996. 1574 p.
- GIACOBBO, C. L.; GOMES, F. R. C.; KROTH, L. L.; CONCEIÇÃO, M. K.; FORTES, G. R. de L. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira Cv. Marubakaio (*Malus prunifolia*) com diferentes níveis de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 1, p. 31-33, jan./mar. 2003.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 183-260.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-169.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R. **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1993. v. 1, p. 177-227.

JULIANI JR, H. R.; KOROCH, A. R.; JULIANI, H. R.; TRIPPI, V. S. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 59, n. 3, p. 175-179, 1999.

JURACK, D. J.; DA LUZ, C. L.; LUZ, C. L.; DALL'OGGIO, E. I.; GONÇALVES, L. M.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S. Germinação *in vitro* e aclimatação de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras-MG: UFLA, 2003. p. 201.

KUMAR, A.; BENDER, L.; NEUMANN, K. H. Growth regulation, plastid differentiation and the development of a photosynthetic system in cultured carrot root explants as influenced by exogenous sucrose and various phytohormones. **Plant Cell, Tissue and Organ Tissue Culture**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 11-28, 1984.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v. 62, n. 3, p. 271-276, Sept. 1988.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n.1, p. 176-177, 1962.

MEDEIROS, L. A.; RIBEIRO, C. S.; GALLO, L. A.; OLIVEIRA, E. T.; DEMATTÊ, M. E. S. P. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, n. 2, p. 165-169, Feb. 2006.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 220 p.

MERCIER, H.; NIEVOLA, G. B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and**

forest. 40: High Tech and Micropropagation VI. Berlin: Springer-Verlag, 2003. p. 43-57.

MORELLI, I. Constituenti e usi della *Melissa officinalis*. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, Milan, v. 116, n. 6, p. 334-340, gin. 1977.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAVES, V. C. **Propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcanterea imperialis* (Carrière) Harms.** 2001. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S. O. Avaliação da micropropagação comercial de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 415-420, abr. 1997.

OZAIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L.: evidence for somatic embryogenesis. **Protoplasma**, New York, v. 110, n. 2, p. 95-105, 1982.

PASQUAL, M.; BARROS de, I. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 7, p. 1017-1019, jul. 1992.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 30, n. 2, p. 251-256, mar./abr. 2006.

SOUZA, A. V.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 27, p. 1532-1538, 2003. Edição Especial.

CAPÍTULO II

Micropropagação de *Melissa officinalis* L., em função de volumes de meio de cultura e posição do explante

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os volumes de meio e o tipo de explante na micropropagação de *Melissa officinalis*. Quatro volumes de meio MS: 10, 20, 30 e 40 mL e três tipos de explantes: segmento apical, segmento nodal de origem mediana e segmento nodal de origem basal foram avaliados. Os experimentos foram implantados no delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro composto por 5 repetições com 5 frascos por repetição e o segundo com 7 repetições e 4 tubos por repetição. Após 30 dias foram realizadas as avaliações: no primeiro experimento o número de brotos, o número de nós, o comprimento do maior broto, o número de raízes principais e a taxa de sobrevivência e, no segundo experimento avaliou-se o número de brotos, o número de nós e o comprimento do maior broto. Constatou-se que o volume de meio influenciou significativamente o número de nós e o comprimento da maior brotação. Com relação ao tipo de explante observou-se que os segmentos nodais obtidos das posições mediana e basal produziram um maior número de brotos e o segmento apical produziu brotos com maior número de nós e maior comprimento.

Palavras-chave: *Melissa officinalis*, planta medicinal, cultura de tecidos.

ABSTRACT

Micropropagation of *Melissa officinalis* L. in function of culture medium volume of and explant types

The present work had as objective to evaluate the volume and the explant types in the *Melissa officinalis* micropropagation. Four volume of MS medium: 10, 20, 30 and 40 mL and three explant types were evaluated: apical segment, nodal segment of medium origin and nodal segment of basal origin. The experiments were carried out completely randomized design, being the first composed by 5 replication with 5 flasks per replication and the second with 7 repetitions and 4 tubes per replication. After 30 days the evaluations were accomplished, was evaluated for the first experiment the number of shoots, number of nodes, length of the largest shoot, number of main roots and survival rate and for the second experiment were appraised the number of shoots, number of nodes and length of the largest shoot. It was verified that the volume of medium influenced significantly the number of nodes and the length of the largest shoot. The type of explant was observed that the nodal and basal types produced a larger number of shoots and the apical segment produced shoots with larger number of nodes and larger length.

Key words: *Melissa officinalis*, medicinal plant, tissue culture.

INTRODUÇÃO

Acredita-se que a utilização de plantas medicinais, como terapia curativa e preventiva, seja tão antiga quanto o homem (Martins et al., 1998). O homem primitivo, na busca de vegetais para a sua alimentação, já selecionava algumas plantas para o tratamento de suas enfermidades.

No Brasil, o crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos é da ordem de 15% ao ano, enquanto o crescimento anual do mercado de medicamentos sintéticos gira em torno de 3% a 4% (ABIFITO, 2001).

Melissa officinalis, conhecida popularmente como erva cidreira ou melissa, é uma planta arbustiva de origem mediterrânea e asiática, da família Lamiaceae, podendo atingir de 20 a 80 cm de altura. As folhas são de cor verde-intenso, na parte superior e verde-claro, na parte inferior. As flores, quando surgem, são brancas ou amareladas, podendo se tornar rosadas com o passar do tempo.

Acredita-se que a melissa apresenta inúmeras propriedades medicinais como diminuição de gases e cólicas, estimulante da transpiração, calmante, sedativa, digestiva, age contra a insônia, enxaqueca, tensão nervosa, ansiedade e ajuda nos casos de traumatismo emocional.

Na micropropagação de uma espécie, o primeiro passo é o estabelecimento *in vitro* de plantas, o que se inicia com a seleção dos explantes mais adequados. Diversos explantes podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta. Na seleção desses, devem ser considerados aspectos, como o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação (Grattapaglia & Machado, 1998).

Verificando a regeneração *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) Crespo et al. (2003) estudaram três tipos de explantes (basal, mediano e

apical) e observaram que o explante apical produziu maior número de brotos, de nós, número de folhas, maior altura de brotos e maior número de raízes.

Murashige (1977) afirmou que quanto menor o explante, menor a quantidade de meio a ser utilizado. Para ápices caulinares de batata-doce e batata, 4 mL de meio líquido são suficientes para a diferenciação e o crescimento inicial. Entretanto, em culturas estabelecidas, a taxa de crescimento é diretamente proporcional à quantidade de meio.

Carvalho et al. (1995), estudando a influência de fatores físicos no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de batata-doce (*Ipomoea batatas*), verificaram que 10 mL de meio de cultura por frasco com quatro explantes, proporcionaram maior formação de gemas em relação aos volumes de 20 e 30 mL.

A quantidade de meio utilizada é uma variável que tem recebido pouca atenção. Ela afeta diretamente a área superficial da interface meio-atmosfera, o volume de ar sobre o meio e a profundidade do meio. (Grattapaglia & Machado, 1998).

Assim, o objetivo no presente trabalho foi verificar a influência do volume de meio e do tipo de explante na micropropagação de *Melissa officinalis* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras.

Experimento I: Diferentes volumes de meio na micropropagação de *Melissa officinalis* L.

Segmentos nodais foram utilizados como fonte de explantes obtidos de plântulas de melissa pré-estabelecidas *in vitro*. Foram inoculados cinco explantes por frasco de 12 cm de altura e volume interno de 300mL, contendo os diferentes volumes de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), que foram de 10, 20, 30 e 40mL.

Os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento, à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas luz, sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo cada tratamento composto por 5 repetições e 5 frascos por repetição.

A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação dos explantes e incluiu número de brotos, número de nós, comprimento do maior broto, número de raízes principais e taxa de sobrevivência.

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2000), tendo sido realizada a análise de variância, com aplicação do teste F, a 5% de probabilidade e as médias analisadas por regressão polinomial.

Experimento II: Tipos de explante na propagação *in vitro* de *Melissa officinalis* L.

O experimento foi constituído de três tratamentos: segmento apical, segmento nodal proveniente de região mediana e segmento nodal proveniente de região basal. Os segmentos utilizados foram obtidos de plântulas preestabelecidas *in vitro*, sendo estes inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 12 ml de meio MS.

Os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas luz, sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo cada tratamento composto por 7 repetições e 4 tubos por repetição, totalizando 28 tubos por parcela.

A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação dos explantes, compreendendo número de brotos, número de nós e comprimento do maior broto.

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2000), tendo sido realizada a análise de variância, com aplicação do teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Diferentes volumes de meio na micropropagação de *Melissa officinalis* L.

O volume de meio influenciou significativamente as variáveis número de nós e comprimento do maior broto, sendo o efeito linear mais adequado para explicar os resultados ($p \leq 0,05$). Já para as variáveis número de brotos, número de raízes principais e taxa de sobrevivência, os diferentes volumes de meio não tiveram influência significativa.

Para as variáveis número de nós e comprimento do maior broto, observou-se que, à medida que aumenta o volume do meio de cultura há uma tendência de aumento das duas variáveis (Figura 1 e 2).

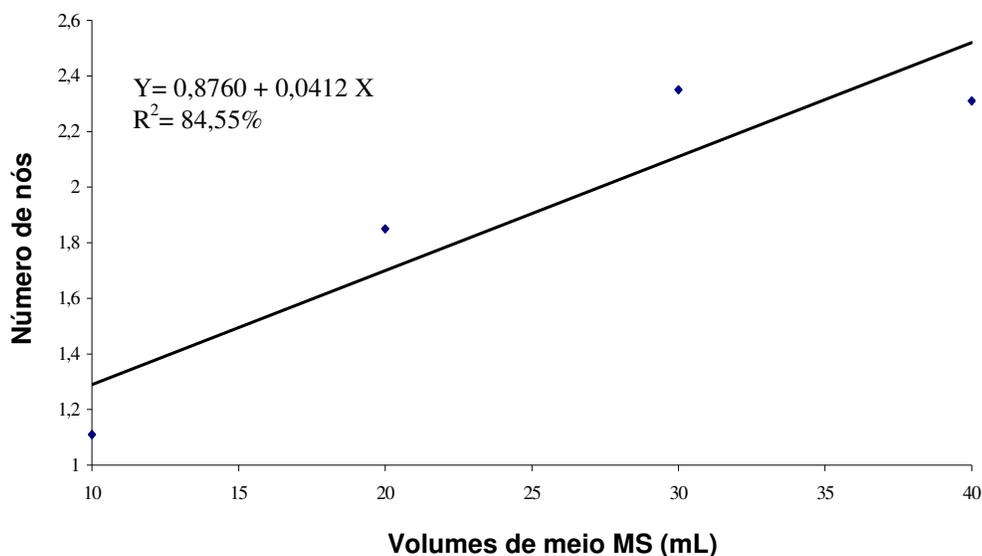


FIGURA 1: Número médio de nós por planta de *Melissa officinalis* L. cultivada em diferentes volumes de meio MS, após 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras-MG, 2007.

*Significativo, a 5%, pelo Teste de F.

Para o comprimento médio do maior broto observou-se que até o volume de 40 mL foi observado brotos com maior comprimento (7,57 cm) e no volume de 10 mL observou-se plântulas com 2,54 cm, sendo o menor comprimento por broto obtido (Figura 2).

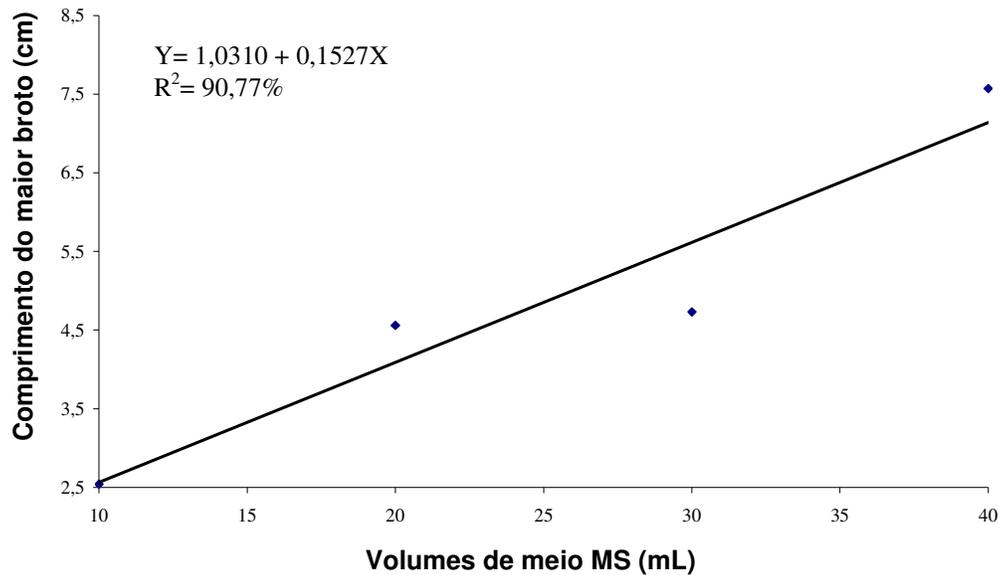


FIGURA 2: Comprimento do maior broto de *Melissa officinalis* L. cultivada em diferentes volumes de meio MS, após 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras-MG, 2007.

* Significativo, a 5%, pelo Teste de F.

A adequada disponibilidade de nutrientes para as plântulas ocorreu nos frascos que continham maior volume de meio, devido à maior disponibilidade de nutrientes. Aliada ao menor volume de meio houve também a competição por nutrientes entre plântulas dentro do frasco, visto que foram utilizadas cinco explantes por frasco. Dessa forma, menor volume de meio e cinco plântulas por frasco levaram à maior competição por nutrientes e, conseqüentemente, à

redução do crescimento *in vitro*. Em contrapartida, quando os explantes foram micropropagados em volume maior de meio, houve tendência de menor competição entre as plântulas e, conseqüentemente, maior crescimento, devido ao melhor aproveitamento dos nutrientes. Isso explica o fato das plântulas terem alcançado maior comprimento e número de nós, além de maior vigor, verdes e com alta taxa de sobrevivência (88%), apesar de não significativa para esta variável (Figura 3).

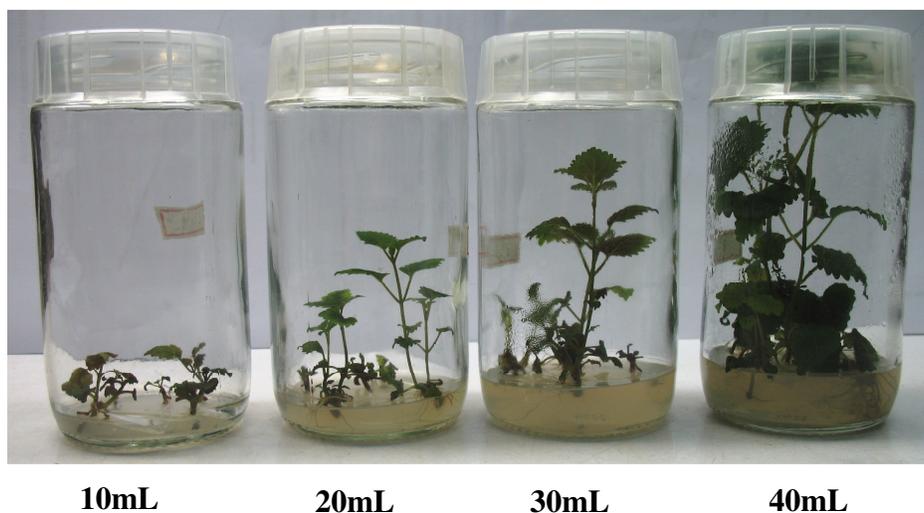


FIGURA 3: Volumes de meio no crescimento *in vitro* de segmentos nodais de *Melissa officinalis* L., após 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras-MG, 2007.

Resultados semelhantes foram observados por Reis et al. (2004). Esses autores estudaram os tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha*), testando os volumes de 10, 20, 30 e 40 mL de meio. Os melhores resultados foram obtidos com os volumes de 30 e 40 mL.

Pereira (2006), estudando a proliferação *in vitro* de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio (10, 15, 20, 25 e 30 mL), observou que à

medida que aumenta o volume de meio, aumenta também o número de brotos de curauá. Já Rodrigues et al. (2005) verificaram maior proliferação de brotos de *Cattleya persivaliana* em frascos contendo 50 mL de meio, quando comparados com aqueles de 25, 75, e 100 mL.

Assim, infere-se que o rendimento esperado do cultivo *in vitro*, em se tratando do volume de meio de cultura, será em função do programa de desenvolvimento de cada espécie vegetal.

Experimento II: Tipos de explante na propagação *in vitro* de *Melissa officinalis* L.

Os diferentes tipos de explante influenciaram significativamente nas variáveis analisadas ($p \leq 0,05$).

Para a variável número de brotos os segmentos nodais provenientes das regiões mediana e basal produziram maior número de brotos (1,85 e 1,89 brotos respectivamente) e o segmento apical produziu o menor número de brotos (1,07 brotos), conforme Figura 4.

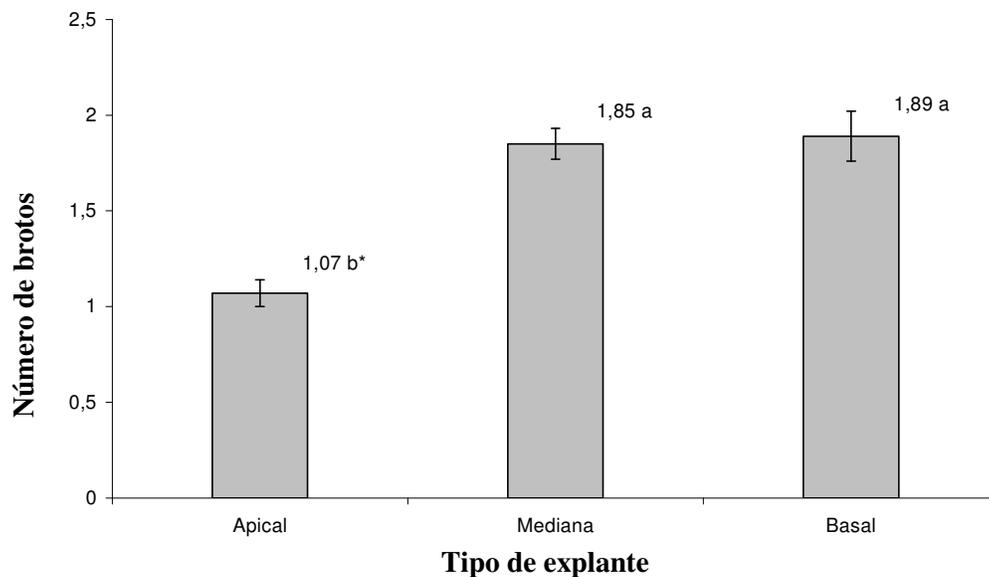


FIGURA 4: Número de brotos de *Melissa officinalis*, em função do tipo de explante retirado na plântula após 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras-MG, 2007.

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

As barras indicam o erro padrão de cada tratamento.

O menor número de brotos foi produzido pelo segmento apical devido ao balanço hormonal que induz à forte dominância apical, em que houve a formação, em média, de um broto por planta. Já no segmento nodal, tanto da região mediana quanto basal da plântula, havia a presença de duas gemas laterais, conseqüentemente produzindo, em média, dois novos brotos por planta.

Com relação ao número de nós, o segmento apical produziu plântulas com um maior número (4,62 nós por plântula). Já para os segmentos nodais provenientes das regiões mediana e basal, o número de nós foi menor (3,14 e 2,74 nós por plântula, respectivamente) como se pode observar na Figura 5.

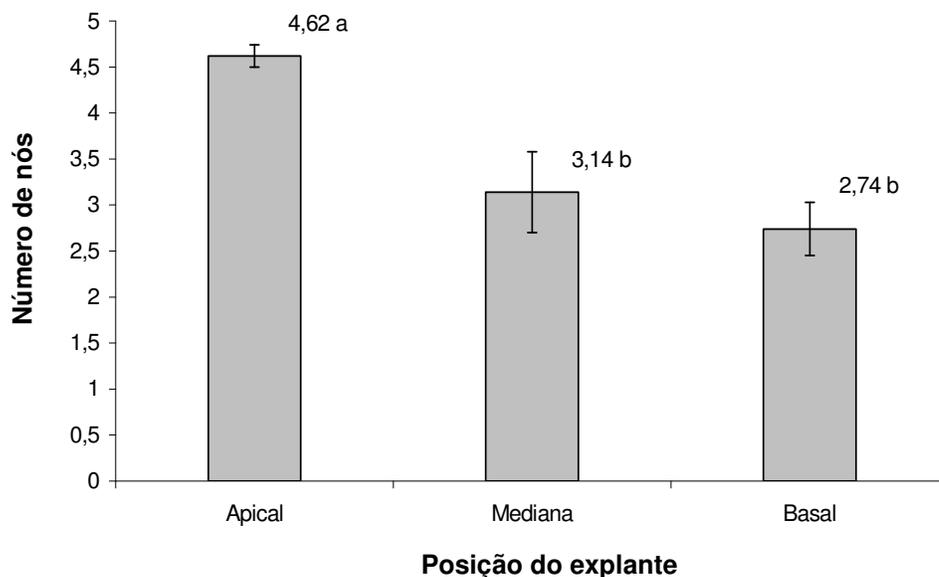


FIGURA 5: Número de nós de *Melissa officinalis*, em função da posição do explante retirado na plântula. UFLA, Lavras-MG, 2007.

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

As barras indicam o erro padrão de cada tratamento.

Taiz & Zeiger (2004) afirmam que o segmento apical possui um balanço hormonal que induz forte dominância apical na formação da planta. Isso explica o fato deste explante apresentar maior número médio de segmentos nodais por brotação, demonstrando a compensação na distribuição da biomassa produzida, em consequência das plantas originadas desse segmento nodal apresentarem menor número de brotações.

Resultados semelhantes foram observados para a variável comprimento do maior broto, em que um maior comprimento foi obtido de segmentos apicais, produzindo plântulas que apresentaram, em média, 9,1 cm. Já para os segmentos nodais obtidos da região mediana e basal, os comprimentos foram menores, ou seja, em média, 4,46 e 3,22 cm, respectivamente (Figura 6).

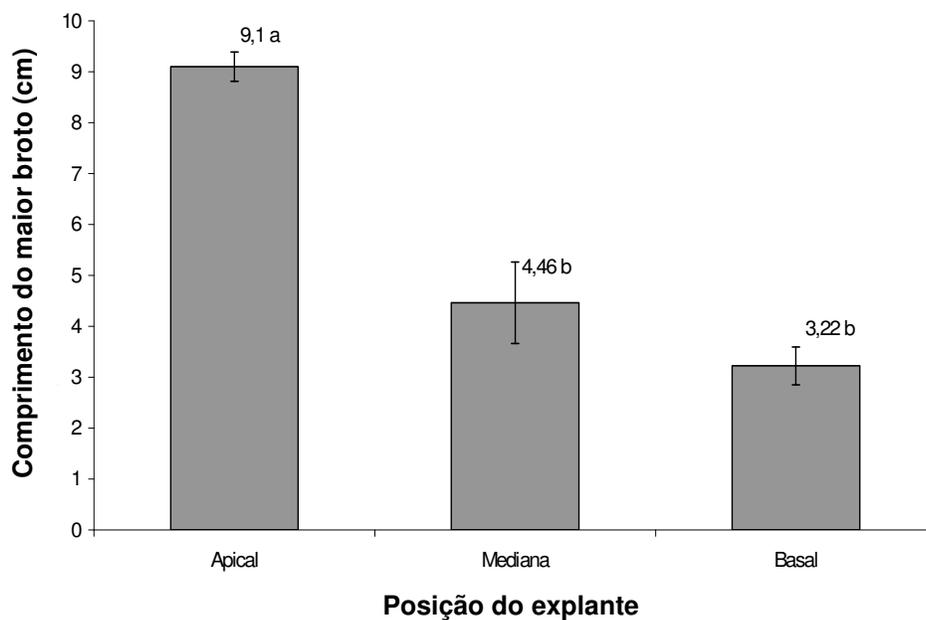


FIGURA 6: Comprimento do maior broto de *Melissa officinalis*, em função da posição do explante retirado na plântula. UFLA, Lavras-MG, 2007.

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

As barras indicam o erro padrão de cada tratamento.

Segundo Torres et al. (1998), gemas apicais, normalmente, apresentam maior capacidade de crescimento do que gemas axilares, devido ao efeito da dominância apical. Entretanto, é freqüente a opção pelo uso de gemas axilares, em função de ocorrerem em maior número por planta matriz.

Resultados semelhantes ao presente trabalho foram observados por Nicoloso & Erig (2002), estudando o efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata* (ginseng brasileiro) *in vitro*, observaram que segmentos apicais produziram menor número de brotos, mas com um maior número de nós e que segmentos basais proporcionaram maior número de brotos e plântulas com maior comprimento.

Pereira & Fortes (2001), ao estudarem a multiplicação e a aclimação da macieira, influenciadas pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento observaram que os explantes de origem basal proporcionaram a formação de um maior número de brotações (12,04 brotos) e com maior comprimento (2,04 cm). Já os explantes de origem apical produziram, em média, 7,37 brotos com 1,68 cm de altura.

Já Sousa & Miranda (2002), estudando o efeito do tipo de explante e da relação IBA/BAP na micropropagação de *Catharanthus roseus*, obtiveram resultados diferentes aos resultados encontrados para melissa para a variável número de brotos, onde o segmento apical produziu um maior número de brotos em relação ao segmento nodal.

De acordo com Pierik (1990) e Grattapaglia & Machado (1990), são comuns os efeitos da posição dos explantes sobre a multiplicação *in vitro*. O uso de segmentos de origem basal e apical pode causar uma fonte de variação na resposta final e, dessa forma, provocar erros na estimativa da multiplicação. Isso confirma os resultados deste experimento e salienta a importância de se trabalhar com material vegetal homogêneo, para maior precisão na estimativa da multiplicação.

CONCLUSÃO

O volume de meio de cultura influencia no crescimento *in vitro* de melissa, sendo que à medida que aumenta o volume de meio há tendência de aumento do número de nós e comprimento do maior broto.

A posição do segmento caulinar influencia na micropropagação de melissa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE FITOTERÁPICOS - ABIFITO. Perspectivas do setor de fitoterápicos. In: REUNIÃO TÉCNICA SOBRE RECURSOS GENÉTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS – estratégias para conservação e manejo sustentável, 1., 2001, Brasília. **Relatório...** Brasília: IBAMA/CENARGEN, 2001. Não publicado.
- CARVALHO, R.; FAVARETTO, N.; PINTO, J. E. B.; DESCHAMPS, C.; INNECCO, R. Influência de fatores físicos no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Poir]. **Ciência e Prática**. Lavras, MG, v. 19, n. 2, p. 158-164, abr./jun. 1995.
- CRESPO, L. E.; CASTRO, H. G.; CAMPOSTRINI, E.; LEAL, N. R.; BARRETO, G. S. Regeneração *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 161.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 183-260.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPQ, 1990. p. 610-612.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. Plantas Medicinais. Viçosa, MG: UFV, 1998. 220 p.
- MURASHIGE, T. Clonal crops through tissue culture. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENCK, M. H. (Ed.). **Plant tissue culture and its biotechnological application**. New York: Springer-Verlag, 1977. p. 392-406.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1499-1506, 2002. Edição Especial.

PEREIRA, F. D. **Propagação *in vitro* do curauá [*ananás Erectifolius* (l.b.sm) – bromeliaceae] a partir de brotos estiolados e caracteres anatômicos de folhas**. 2006. 78 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Multiplicação e aclimação da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 417-420, ago. 2001.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madri: Mundi Prensa, 1990. 326 p. 1

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; CORRÊA, R. M. BERTOLUCCI, S. K. V.; LAMEIRA, O. A. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 703-709, maio/jun. 2004.

RODRIGUES, J. D.; ARAÚJO, A. G.; ASSIS, F. A. A.; CAVALLARI, L. L.; PASQUAL, M. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas: quantidade de meio de cultura e número de explantes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.2, p. 616, ago. 2005. Suplemento.

SOUSA, C. M.; MIRANDA, R. M. Efeitos do tipo de explante e da relação AIB/BAP na micropropagação de *Catharanthus roseus*. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida, Seropédica, v. 22, n. 2, p. 217-222, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004. 719 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, p. 11-19, 1998.

CAPÍTULO III

Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro*, sob a influência do meio de cultura

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito do meio de cultura na produção e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis*, foi realizado o presente trabalho, avaliando três concentrações do meio de cultura MS. O experimento foi implantado em delineamento inteiramente casualizado, com 7 repetições, em que cada repetição foi representada por uma amostra de 20 g de plântulas frescas. A extração do óleo foi realizada em aparelho de Clevenger Modificado, com duração de 1 hora e 30 minutos e a análise química foi realizada por cromatografia gasosa. Observou-se que o teor e a composição química do óleo essencial de *M. officinalis*, foram influenciados pela concentração de sais do meio MS. As plântulas que se desenvolveram nos meios MS e MS/4 apresentaram um maior teor de óleo essencial, tendo os componentes majoritários sido o geranial (25,23% e 16,21%, respectivamente) e o neral (24,5% e 20,53%, respectivamente). Já o componente majoritário presente no óleo de plântulas de melissa cultivadas em meio MS/2 foi o acetato de nerila (18,69%).

Palavras chave: *Melissa officinalis*, planta medicinal, óleo essencial, cultura de tecidos.

ABSTRACT

Content and chemical composition of the essential oil of *Melissa officinalis* L. *in vitro* under influence of the culture medium

With the objective to evaluate the effect of the culture medium in the content and chemical composition of the essential oil of *Melissa officinalis* was carried out the present work, evaluating three concentrations of MS culture medium. The experiment was in the completely randomized design, with 7 replications each replication was represented by 20 g of fresh biomass. The oil extraction was accomplished in Clevenger Modified apparatus for 1 hour and 30 minutes and the chemical analysis was accomplished by gaseous chromatography. It was observed that the content and the chemical composition of the essential oil of *M. officinalis*, was influenced by the concentration of MS medium. The plants grown in MS medium and MS/4 presented a larger content of essential oil, the majority components of these plants were the geraniol (25.23% and 16.21% respectively) and nerol (24.5% and 20.53% respectively). The major component present in the oil of melissa plants cultivated in MS/2 was medium neryl acetate (18.69%).

Key words: *Melissa officinalis*, medicinal plant, essential oil, tissue culture.

INTRODUÇÃO

Planta originária da região que circunda o Mediterrâneo e também a Ásia, *Melissa officinalis* L., conhecida popularmente como erva cidreira, é uma planta arbustiva, da família Lamiaceae, podendo atingir de 20 a 80 cm de altura. Os caules, ramificados a partir da base, formam touceiras. As folhas são de cor verde-intenso na parte superior e verde-claro na parte inferior. As flores, quando surgem, são brancas ou amareladas, podendo se tornar rosadas com o passar do tempo (Launert, 1989). Toda a planta emana um odor semelhante ao do limão, que se torna mais intenso depois que a planta seca.

Acredita-se que a melissa apresente inúmeras propriedades medicinais como diminuir gases e cólicas, estimular a transpiração, além de ser calmante, sedativa, digestiva, agir contra insônia, enxaqueca, tensão nervosa, ansiedade e ajuda nos casos de traumatismo emocional.

O óleo essencial encontra-se em toda a planta, mas sua composição e teor específico variam de acordo com a parte da planta selecionada (Silva, 1998), as condições climáticas de desenvolvimento, a época de colheita, a origem das plantas, a preparação das amostras e as técnicas de isolamento. Os rendimentos em óleo essencial de *M. officinalis* obtidos por hidrodestilação são habitualmente muito baixos (0,02% a 0,40%) tornando-se, assim, pertencente a uma das classes mais preciosas de óleo essencial, apresentando alto preço, comparado aos preços do óleo essencial de rosas e de flor de laranja (Sorensen, 2000).

Estudos da composição química do óleo essencial obtido de folhas de *Melissa officinalis in vitro* mostram a presença dos componentes majoritários citrionelal (2%-40%) e citral (mistura de neral e geranial: 10%-30%), seguidos pelo β -cariofileno, germancreno D, ocimeno e citrionelol (Silva et al., 2005).

O meio ambiente e os fatores nutricionais, bem como o meio de cultura podem controlar o cultivo *in vitro*. Além de facilitar a propagação das plantas, as técnicas *in vitro* podem auxiliar vantajosamente no estudo da produção, acúmulo e metabolismo de importantes metabólitos secundários (Hypolyte, 2000; Panagiotopoulos, 2000).

Vários trabalhos têm sido realizados, com diferentes espécies medicinais com a finalidade de determinar a produção e a composição química do óleo essencial de plantas cultivadas *in vitro*.

Guedes et al. (2003) estudaram a produção de óleo essencial de plantas de *Hypericum androsaemum* L. que foram cultivadas em meio que continha os macronutrientes de Margara N30K (1989) e os micronutrientes e constituintes orgânicos do meio de Murashige & Skoog (1962), com exceção da tiamina, da qual foram usados 0,8 mg L⁻¹.

Estudando a produção de óleo essencial de brotos *in vitro* de sálvia (*Salvia officinalis*), Gomes & Ferreira (2003) utilizaram, como meio de cultura básico, o MS suplementado com diferentes combinações de citocininas. Esses autores observaram que o tipo e a concentração da citocinina influenciaram no acúmulo de óleo essencial.

De acordo com as pesquisas levantadas neste trabalho, infere-se que a capacidade de produção e o acúmulo de óleo essencial de brotos *in vitro* de *M. officinalis* não foram ainda suficientemente estudados. Sendo assim, o objetivo neste trabalho foi estudar o teor e a composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L., a partir de parte aérea cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de meio MS.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de março a agosto de 2006.

Plântulas pré- estabelecidas *in vitro* a partir de sementes germinadas em meio com 25% da concentração dos sais do MS, foram utilizadas como doadoras de explantes para a condução do ensaio. As plântulas foram multiplicadas em meio MS a partir de segmentos nodais e apicais, a fim de se obter o estande ideal para a extração de óleo essencial. A partir da obtenção do número de plântulas ideal estas foram repicadas em segmentos nodais e apicais, que foram inoculados nos respectivos meios de cultura: MS com a concentração completa dos sais, MS com a metade da concentração dos sais (MS/2) e MS com um quarto da concentração dos sais (MS/4), que representam os tratamentos.

Extração, teor e composição química do óleo essencial

Cada amostra foi composta por 20 g de plântulas frescas (aproximadamente 180 plântulas, com cerca de 6 cm, em média, cada).

Após pesada, a amostra foi imediatamente vertida em balão de 1 L contendo 300 mL de água destilada. Posteriormente balão foi colocado em aparelho de Clevenger Modificado, para a hidrodestilação, por 1 hora e 30 minutos de duração. O hidrolato coletado foi particionado com diclorometano, na proporção de ¼ do total obtido, dividido em três vezes. Como dessecante, foi adicionado sulfato de magnésio anidro, durante 24 horas, e, após esse período, a solução foi filtrada. Em seguida, o sal foi removido por filtração simples e o

solvente evaporado à temperatura ambiente, sob capela de exaustão de gases sendo, posteriormente, determinada sua massa residual.

As análises químicas foram realizadas em um aparelho de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro quadrupolar de massas (CG-EM), Shimadzu QP5050A (Kyoto, Japão), nas seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida, modelo CBP-5 (30 m de comprimento \times 0,25 mm de diâmetro interno \times 0,25 μ m de espessura do filme em 5% de fenilmetilpolisiloxano) (Shimadzu, Japão), com fluxo de 1 ml.min⁻¹ de hélio como gás de arraste; aquecimento com temperatura programada (60°C com um gradiente de 3°C.min⁻¹ até 240°C e, em seguida, com um gradiente de 10°C.min⁻¹ até 270°C, mantendo-se uma isoterma de 7 min, com um tempo total de corrida de 70 min). A energia de ionização do detector foi de 70 eV, sendo o volume de injeção da amostra de 0,5 μ l diluída em diclorometano (grau ultra-resíduo, Baker, EUA) e uma razão de injeção de 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220°C e 240°C, respectivamente. A análise foi conduzida no modo varredura, à velocidade de 1,0 varredura.s⁻¹, com intervalo de massas de 40-400 *m/z*. A análise quantitativa foi obtida pela integração do cromatograma total de íons (TIC). A identificação dos constituintes foi realizada por comparação automática e manual, dos espectros de massas com os das bibliotecas NIST/EPA/NHI (1998), por comparação dos espectros de massas e índices de retenção (IR) com os da literatura (Adams, 2001) e co-injeção com padrões autênticos. Os IR foram calculados por meio da co-injeção, com uma mistura de hidrocarbonetos, C₈-C₃₂ (Sigma, EUA) e com aplicação da equação de Van Den Dool & Kratz (1963).

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 3 tratamentos, compostos de variações da concentração dos sais do meio MS,

sendo cada tratamento contendo 7 repetições, em que cada repetição foi representada por uma amostra de 20 g de plântulas frescas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2000), sendo o Teste de Skott e Knott o utilizado para se comparar as médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que houve diferença significativa no teor de óleo essencial ($p \leq 0,05$), para as diferentes concentrações do meio MS.

De acordo com a Figura 1, pode-se observar que os maiores teores de óleo foram detectados nas plântulas presentes nos meios MS e MS/4, tendo no meio MS/2, as plântulas produzido menor teor de óleo.

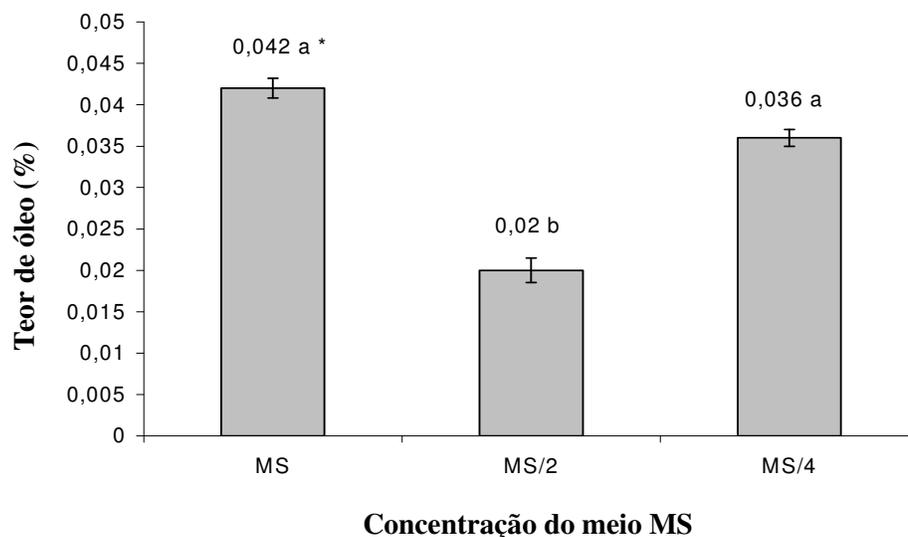


FIGURA 1: Teor de óleo essencial de *Melissa officinalis* L., em função das diferentes concentrações do meio MS. UFLA. Lavras-MG, 2007.

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Scott & Knott a 5% de probabilidade. As barras em evidência indicam o erro padrão da média.

Por este resultado pode-se observar que, possivelmente, plântulas presentes no meio MS produziram um maior teor de óleo essencial, devido à presença de uma concentração ideal de nutrientes para o seu metabolismo; o teor de óleo diminuiu no meio MS/2 devido à redução da concentração de nutrientes

no meio. Já para o meio MS/4, provavelmente, devido à deficiência de nutrientes, a plântula, para promover a sua defesa em uma situação de estresse, produziu maior teor de óleo essencial, visto que o comprimento das plântulas foi diminuindo com a redução da concentração do meio MS (dados não publicados).

Mann (1987) afirma que as rotas dos metabólitos secundários das plantas só são ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais.

A adaptabilidade das plantas em condições de estresse é influenciada pela duração e pela magnitude do estresse, além da variabilidade genética. A concentração de princípios ativos nas plantas depende do controle genético e também das interações genótipo e ambiente, que podem ser desencadeadas em condições de estresse, ou seja, excesso ou deficiência de algum fator do meio ambiente, como água, luz, temperatura e nutrientes, dentre outros (Andrade & Casali, 1999).

Andrade & Casali (1999) também afirmam que o efeito do estresse sobre os produtos do metabolismo secundário das plantas medicinais parece variar bastante com o tipo, a intensidade e a duração do estresse, podendo aumentar ou diminuir o teor de óleos essenciais.

Os componentes majoritários do óleo essencial de *M. officinalis* obtido de plântulas presentes no meio MS e MS/4 foram o geranial (25,23% e 16,21%, respectivamente) e o neral (24,5% e 20,53%, respectivamente). Já o componente majoritário presente no óleo de plântulas de melissa cultivadas em meio MS/2 foi o acetato de nerila (18,69%), mostrando que também o meio influenciou na composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (Tabela 1).

TABELA 1: Composição química do óleo essencial de plântulas *Melissa officinalis* cultivadas em diferentes concentrações do meio MS. UFLA. Lavras-MG, 2007.

Componente	IR	% do componente no óleo essencial			
		MS	MS/2	MS/4	
Desconhecido	1141	2,24	0	1,45	
Citronelal	1152	3,35	0,1	2,00	
Angelato de prenila	1193	2,37	2,1	3,72	
Citral {	Neral	1240	24,5	4,3	20,53
	Geranial	1270	25,23	5,44	16,21
Desconhecido	1296	0,10	0,8	0,10	
Acetato de nerila	1363	6,48	18,69	2,60	
Trans-6-hidroxi- α -terpineol	1374	0,10	10,19	8,77	
Desconhecido	1404	2,24	2,4	3,73	
Desconhecido	1426	3,45	2,2	2,90	
Desconhecido	1529	11,92	3,68	11,55	
Óxido de cariofileno	1585	5,04	3,61	6,59	

A utilização do cultivo de brotos *in vitro* para estudos de óleo essencial não tem sido suficientemente explorada para as espécies medicinais no geral. Não foram encontrados trabalhos relacionando a produção e a composição de óleo essencial com a concentração do meio MS para *Melissa officinalis*. Porém, Silva et al. (2005) estudaram a composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro*, cultivada em meio MS, sendo a pesquisa voltada para a influência dos reguladores de crescimento ácido indol acético (AIA) e benzilaminopurina (BAP). Os autores observaram que tratamentos com 11,42 $\mu\text{M L}^{-1}$ de AIA e 8,87 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BAP resultaram em aumentos de 1,7 e 2,2 vezes na proporção de neral e geranial, respectivamente.

Gomes & Ferreira (2003), estudando a produção de óleo essencial de brotos *in vitro* de *Salvia officinalis*, testando o efeito de oito combinações de reguladores de crescimento adicionados ao meio MS, constataram alto acúmulo de óleo essencial no tratamento que continha a combinação de 2,0 mgL⁻¹ de cinetina e 0,05 mgL⁻¹ de 2,4-D. Os autores também concluíram que o tipo e a concentração do regulador de crescimento não influenciaram a composição química do óleo essencial de brotos *in vitro* de sálvia.

Sudriá et al. (1999), estudando também a influência de reguladores de crescimento no conteúdo de óleo essencial de plântulas de *Lavandula dentada*, concluíram que o meio que continha 0,1 mgL⁻¹ de BA (benziladenina) proporcionou maior conteúdo de óleo, relacionando esse resultado com a maior ocorrência de tricomas glandulares nas plântulas presentes neste meio de cultura.

Pesquisas de Guedes et al. (2003), com plantas *in vivo e in vitro* de *Hypericum androsaemum* L., mostraram que o conteúdo de óleo essencial obtido a partir de brotos cultivados *in vitro* foi seis vezes menor quando comparado com plantas cultivadas *in vivo*. Os autores atribuíram este resultado à imaturidade dos brotos cultivados *in vitro* e também às condições de crescimento das plântulas.

Já Arikat et al. (2004), também comparando o rendimento de óleo essencial de plantas *in vivo e in vitro* de *Salvia fruticosa*, observaram que as plântulas *in vitro* apresentaram maior rendimento em relação às plantas *in vivo* e que os constituintes majoritários detectados no óleo das plantas *in vivo e in vitro* foram similares, sendo eles: α -pireno, 1,8-cineol, camphor e borneol.

Assim, há necessidade de maior estudo sobre o rendimento de óleo essencial de plântulas *in vitro* para as diferentes espécies, devendo-se, também, fazer um estudo comparativo com o rendimento de óleo essencial obtido de plantas *in vivo*.

CONCLUSÃO

As diferentes concentrações de sais do meio MS influenciam no teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured, 2001. 456 p.
- ANDRADE, F. M. C.; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia, 1999.
- ARIKAT, N. A.; JAWAD, F. M.; KARAM, N. S.; SHIBLI, R. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.) **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 100, n. 1/4, p. 193-202, Mar. 2004.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GOMES, P. C. S.; FERREIRA, M. F. Essential oils produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 8, p. 2260-2266, Apr. 2003.
- GUEDES, A. P.; AMORIM, L. R.; VICENTE, A. M. S.; RAMOS, G.; FERREIRA, M. F. Essential oils from plants and *in vitro* shoots of *Hypericum androsaemum* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 5, p. 1399-1404, Feb. 2003.
- HIPPOLYTE, I. *In vitro* rosmarinic acid production. In: KINTZIOS, S. E. (Ed.). **Sage. The Genus Salvia**. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers, 2000.
- LAUNERT, E. **The Hamlyn guide to edible medicinal plants of Britain and Northern Europe**. London: Hamlyn, 1989.
- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database**. Gaithersburg, MD: U. S. Department of Commerce, 1998.
- MANN, J. **Secondary metabolism**. 2. ed. Oxford: Clarendon, 1987.

MARGARA, J. **Bases de la Multiplication Vegetative. Les Méristèmes et l'Organogénese.** Paris, France: Institut National de la Recherche Agronomique, 1989.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PANAGIOTOPOULOS, E.; SKAPETI, M.; KAPETANOS, C. Production of secondary metabolites using liquid culture of *Salvia* plants: up to-date reports and scale-up potential. In: KINTZIOS, S. E. (Ed.). **Sage. The Genlls Salvia.** Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers, 2000.

SILVA, M. J. V. **Expressão da síntese e acumulação de compostos de natureza lipófila em plantas *in vivo* e culturas *in vitro* de *Melissa officinalis* e *Cynara cardunculus*.** 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Minho, Braga, Portugal.

SILVA, S.; SATO, A.; LAGE, C. L. S.; GIL, R. A. S. S.; AZEVEDO, D. A.; ESQUIBEL, M. A. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1387-1390, Nov./Dec. 2005.

SORENSEN, J. M. *Melissa officinalis*. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 10, n. 1/2, p. 7-15, 2000.

SUDRIÁ, C.; PIÑOL, M. T.; PALAZÓN, J. CUSIDÓ, R. M.; VILA, R.; MORALES, C.; BONFILL, M.; CAÑIGUERAL, S. Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of culture *Lavandula dentada* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 177-184, 1999.

VAN DEN DOOL, D. H.; KRATZ, P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 463-471, 1963.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)