



LUCILA ELIZABETH FRAGOSO MONFORT

**CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE
CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE *Ocimum
basilicum* E *Mentha arvensis* POR CULTURA DE
TECIDOS**

LAVRAS – MG

2013

LUCILA ELIZABETH FRAGOSO MONFORT

**CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE
Ocimum basilicum E *Mentha arvensis* POR CULTURA DE TECIDOS**

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

Orientador
Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS – MG
2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Monfort, Lucila Elizabeth Fragoso.

Crescimento e produção de constituintes voláteis de *Ocimum
basilicum* e *Mentha arvensis* por cultura de tecidos / Lucila
Elizabeth Fragoso Monfort. – Lavras : UFLA, 2013.

131 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Bibliografia.

1. Hortelã japonesa. 2. Plantas medicinais. 3. Metabólitos
especiais. 4. Micropropagação. 5. Manjerição. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.88387

LUCILA ELIZABETH FRAGOSO MONFORT

**CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE
Ocimum basilicum E *Mentha arvensis* POR CULTURA DE TECIDOS**

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

APROVADA em 29 de julho de 2013

Dr. Ricardo Monteiro Corrêa	IFMG
Dr ^a . Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA
Dr ^a . Elisangela Elena Nunes Carvalho	UFLA
Dr. Adenilson Henrique Gonçalves	UFLA

Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)

LAVRAS - MG
2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, iluminando os meus caminhos;

Aos meus amados pais, Osias Monfort e Elizabeth Fragoso; minhas irmãs, Lucinda Monfort e Karla Monfort e meu marido, Vinicius Fadul, pelo apoio incondicional, amizade e carinho. Sem o amor de vocês eu não teria conseguido;

Aos professores José Eduardo Brasil Pereira Pinto e Suzan Kelly Vilela Bertolucci, pela orientação, confiança e amizade;

Ao pesquisador Osmar Alves Lameira, pelos ensinamentos durante a graduação, pela amizade e confiança;

A Andreisa Fabri Lima, pela ajuda e amizade no decorrer de todo o trabalho;

À Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade da realização do Doutorado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos;

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais e do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, pela amizade;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi identificar as condições mais adequadas de cultivo *in vitro* que possibilitem melhor crescimento da plântula e produção de constituintes voláteis nas folhas de *Ocimum basilicum* e *Mentha arvensis*. Seis experimentos com ambas as espécies foram realizados: diferentes meios de cultura; diferentes concentrações do meio MS; diferentes segmentos e orientação do explante; diferentes reguladores de crescimento; estágio de desenvolvimento do explante e comparação da fração volátil entre a planta matriz, aclimatizada e cultivada *in vitro*. Para *O. basilicum* o meio MS na concentração normal de sais proporcionou melhor crescimento *in vitro*. O segmento nodal inoculado na orientação horizontal incrementou o crescimento das plântulas. Para esses experimentos, o estragol foi o constituinte mais abundante nas folhas *in vitro*. O uso de auxinas isoladas possibilitou o maior crescimento da plântula *in vitro*, sendo o ANA responsável pelo maior aumento dos teores de linalol. Houve um comportamento crescente dos parâmetros de crescimento no decorrer de 100 dias, porém plântulas de *O. basilicum* devem permanecer por até 2 meses num mesmo meio de cultura. Após a aclimatização ocorreu acúmulo de linalol em plantas de *O. basilicum*. Para a *M. arvensis* os diferentes meios proporcionaram o crescimento de plântulas *in vitro*. Menores concentrações de sais induziram melhor crescimento das plântulas cultivadas *in vitro*. O segmento nodal inoculado na orientação horizontal proporcionou um melhor crescimento dos explantes. Os diferentes reguladores testados influenciaram no crescimento e na composição química da fração volátil das plântulas. Para as variáveis analisadas houve um comportamento crescente dos valores no decorrer de 100 dias e as plântulas não apresentaram sinais de deficiência nutricional. Altos teores de pulegona foram observados em todos os experimentos, porém maior tempo de cultivo eleva os teores de mentol. Plântulas *in vitro* de *M. arvensis* tendem a acumular pulegona, mas após a aclimatização, a planta acumula teores de mentol elevados próximos ao da planta matriz.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Metabólitos especiais. Micropropagação. Lamiaceae.

ABSTRACT

The aim of this research was to study *in vitro* culture conditions for plantlet growth and volatile constituent production in the leaves of *Ocimum basilicum* and *Mentha arvensis*. Six experiments with both species were investigated: different culture media, different MS salt concentration; different segments and explant orientation; different growth regulators; developmental stage of the explant and comparison of the volatile fraction among mother plant, acclimatized and plantlet. *Ocimum basilicum* showed better growth in MS normal salt concentration. And, the nodal segments inoculated in horizontal orientation increased plantlet growth. The estragole was the most abundant constituent in the leaves *in vitro*. Medium supplemented with auxin promoted the highest plantlet growth and ANA was responsible for the largest increase in linalool in leaf. In growth parameters there was an increase during 100 days of culture. However, plantlet of *O. basilicum* should remain for up to 2 months in the same culture medium. After acclimatization occurred linalool accumulation in plants of *O. basilicum*. *Mentha arvensis* the different media provided plantlet growth *in vitro*. Lower MS salts concentrations enhancement plantlet growth. The nodal segments cultured in horizontal position showed better explant growth. And, different growth regulators influenced growth and chemical composition of the volatile fraction in plantlet. There was an increase in parameters analyzed during 100 days of culture and plantlet did no showed signs of nutritional deficiency. High levels of pulegone were observed in all experiments, but older culture the levels of menthol increase. *In vitro* leaves of *M. arvensis* tend to accumulate pulegone, but after acclimatization, the plant accumulates high levels of menthol close to the mother plant.

Keywords: Medicinal plants. Special metabolites. Micropropagation. Lamiaceae.

LISTA DE SIGLAS

AIA	Ácido 3-indolilacético
ANA	Ácido naftalenoacético
AIB	Ácido indolilbutírico
BAP	6-Benzilaminopurina
TDZ	Tiadizuron
MS	meio de cultura de Murashige e Skoog
B5	meio de cultura de Loyd e McCown
WPM	meio de cultura de Gamborg
GC-EM	Cromatográfica gasosa associada à espectrometria de massas

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	10
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Descrição das espécies	13
2.1.1	<i>Ocimum basilicum</i> L.....	13
2.1.2	<i>Mentha arvensis</i> L.....	17
2.2	Cultura de tecidos vegetais	19
2.2.1	Meios de cultura	21
2.2.2	Produção <i>in vitro</i> de metabólitos secundários	23
	REFERÊNCIAS	26
	CAPÍTULO 2 Crescimento e produção <i>in vitro</i> de compostos voláteis de <i>Ocimum basilicum</i> L. sob a influência de fatores químicos.....	36
	RESUMO	37
	ABSTRACT	38
1	INTRODUÇÃO	39
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1	Fase de estabelecimento	41
2.2	Condições gerais dos experimentos	42
2.2.1	Diferentes meios de cultura	43
2.2.2	Variações da concentração dos sais do meio básico MS	43
2.2.3	Orientação de inoculação do segmento nodal	43
2.2.4	Efeito dos reguladores de crescimento	44
2.2.5	Estádio de desenvolvimento do explante	44
2.2.6	Produção de constituintes voláteis na planta matriz, plântula <i>in vitro</i> e aclimatizada	44
2.3	Análises químicas da fração volátil	45
2.4	Análise estatística	47
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1	Diferentes meios de cultura	47
3.2	Variações da concentração dos sais do meio básico MS	51
3.3	Orientação de inoculação do segmento nodal	55
3.4	Efeito dos reguladores de crescimento	59
3.5	Estádio de desenvolvimento do explante	67
3.6	Produção de constituintes voláteis na planta matriz, plântula <i>in vitro</i> e aclimatizada	73
4	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	CAPÍTULO 3 Crescimento e produção <i>in vitro</i> de compostos voláteis de <i>Mentha arvensis</i> L. sob a influência de fatores químicos.....	85

	RESUMO	86
	ABSTRACT	87
1	INTRODUÇÃO	88
2	MATERIAL E MÉTODOS	90
2.1	Fase de estabelecimento	90
2.2	Condições gerais dos experimentos.....	91
2.2.1	Diferentes meios de cultura.....	92
2.2.2	Variações da concentração dos sais do meio básico MS.....	92
2.2.3	Diferentes segmentos e orientação de inoculação	92
2.2.4	Efeito dos reguladores de crescimento	93
2.2.5	Estádio de desenvolvimento do explante.....	93
2.2.6	Produção de constituintes voláteis na planta matriz, plântula <i>in vitro</i> e aclimatizada.....	93
2.3	Análise química da fração volátil.....	94
2.4	Análise estatística.....	96
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1	Diferentes meios de cultura	96
3.2	Variações da concentração dos sais do meio básico MS.....	100
3.3	Diferentes segmentos e orientação de inoculação	105
3.4	Efeito dos reguladores de crescimento	109
3.5	Estádio de desenvolvimento do explante.....	116
3.6	Produção de constituintes voláteis na planta matriz, plântula <i>in vitro</i> e aclimatizada.....	123
4	CONCLUSÃO	124
	REFERÊNCIAS	125

CAPÍTULO 1
Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por óleos essenciais de qualidade é enorme, havendo cerca de 300 óleos essenciais de importância comercial no mundo, dentre esses se citam os óleos de plantas do gênero *Mentha* e *Ocimum*. O mercado mundial de óleos essenciais gira em torno de US\$ 15 milhões/ano, apresentando crescimento aproximado de 11% por ano e o Brasil se destaca na produção mundial de óleos essenciais, especialmente de frutos cítricos, mas sofre de problemas crônicos como falta de manutenção do padrão de qualidade (BIZZO et al., 2009).

Óleos essenciais ou seus constituintes isolados têm sido usados em indústrias de alimentos, perfumaria e farmacêutica, por seus intensos aromas e pelas propriedades antibacteriana, fungicida, inseticida, entre outras. Quimicamente, a grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados de fenilpropanoides ou de terpenoides (MISHARINA, 2001).

Segundo Nogueira e Romano (2002) espécies aromáticas não são tão produtivas a campo e apresentam dificuldades como baixa síntese de metabólitos secundários devido à própria variabilidade genética das espécies. Para obtenção de matéria prima vegetal de qualidade é necessário, seja através de biotecnologia ou de meios convencionais, identificar, reconhecer e, constantemente, monitorar os eventos que modulam o metabolismo secundário (BRUNI; SACCHETTI, 2005).

A cultura de tecidos vegetais oferece uma alternativa agrônômica para a produção de metabólitos economicamente importantes tais como flavorizantes, corantes, aromatizantes e farmacêuticos dentro de condições laboratoriais controladas (VERPOORTE et al., 2002; VANISREE et al., 2004). Culturas celulares apresentam vantagens como reprodutibilidade, direcionamento para produção de substâncias de interesse, facilidade de isolamento de compostos e

possibilidade de isolamento em grande escala. Já o isolamento de compostos bioativos de plantas obtidas por extrativismo ou cultivo em campo pode ser trabalhoso e representa um obstáculo para os estudos farmacêuticos ou aplicações industriais (NITZSCHE et al., 2004).

Culturas de tecidos e células vegetais são consideradas fábricas de metabólitos secundários (RAO; RAVISHANKAR, 2002), que podem ser alterados qualitativamente e quantitativamente pela alteração na composição nutricional do meio, presença de reguladores de crescimento isolados ou combinados, adição de elicitores ou por exposição a fatores de estresse (NITZSCHE et al., 2004).

Nas últimas décadas, a cultura de tecidos e células tem demonstrado ter um papel importante na produção de metabólitos secundários. Essa técnica é adequada para o estudo das vias biossintéticas e sua relação entre a produção desses metabólitos e o crescimento celular, cujos fatores são importantes para futuras aplicações industriais (BOONSNONGCHEEP et al., 2010). Assim, a aplicação de sistemas de produção de metabólitos secundários *in vitro* é possível, mas requer um aprofundamento do entendimento da regulação fisiológica de sua biossíntese e da otimização das condições culturais (MATKOWSKI, 2004).

Produção de mentol por cultura de tecidos e células vegetais tem sido investigada em algumas espécies de *Mentha*, tais como *Mentha piperita* (CHANG et al., 1998), *Mentha arvensis* (PHATAK; HEBLE, 2002), mas frente ao grande número de fatores que podem afetar a síntese de metabólitos secundários *in vitro*, muito há ainda a investigar apesar da via biossintética e local de armazenamento desse óleo essencial já estarem bem estudados (CROTEAU et al., 2005).

Alguns protocolos de micropropagação também já foram desenvolvidos para espécies de *Ocimum*, tais como *O. basilicum* (RIBEIRO et al., 2007) e *O.*

gratissimum (GOPI et al., 2006). Porém, ainda são incipientes os estudos sobre a produção de óleos essenciais *in vitro* com espécies desse gênero.

Com base no exposto, objetivou-se identificar condições de cultivo *in vitro* que possibilite melhor crescimento e produção de constituintes voláteis nas folhas de *O. basilicum* e *M. arvensis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição das espécies

2.1.1 *Ocimum basilicum* L.

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.) (Figura 1) possui entre 50 e 150 espécies na Ásia Tropical, África, América Central e América do Sul. Essa espécie é comercialmente cultivada para utilização de suas folhas verdes e aromáticas, usadas frescas ou secas como aromatizante ou tempero (ÖZCAN; CHALCHAT, 2002). Reis et al. (2007) relatam que sua implantação no país se intensificou após a chegada de imigrantes italianos, sendo que para este público a planta faz parte de uma tradição culinária muito forte.



Figura 1 Planta de manjeriçao (*Ocimum basilicum* L.). A) Planta jovem com 45 dias, B) Planta com inflorescência e C) Inflorescência.

A planta é muito ramificada, de 30 a 50 cm de altura, é um subarbusto aromático, anual ou perene, dependendo da região de cultivo. A propagação pode ser feita por estaquia ou sementes, podendo ser plantado o ano todo; possui folhas simples, membráceas, margens onduladas e nervuras salientes, de 4 a 7 cm de comprimento; sua inflorescência é do tipo cimeira espiciforme e suas flores são brancas, rosa ou arroxeadas; o fruto é do tipo aquênio com sementes pequenas, pretas e oblongas (COUTO, 2006).

Extratos de *Ocimum basilicum* L. são usados como agente antimicrobiano, agente medicinal, como aromatizante em alimentos e fragrância em produtos farmacêuticos (MAZUTTI et al., 2006). A medicina alternativa

utiliza as folhas e flores do manjericão para obtenção de chás por suas propriedades tônicas e digestivas, além de auxiliar no tratamento de problemas respiratórios e reumáticos. É também utilizado na culinária popular sob a forma de condimento, para tempero de omeletes, ensopados de carnes, peixes, frangos, saladas, sopas, recheios, como ingrediente principal em molho típico italiano, bem como em doces e licores (FAVORITO et al., 2011).

O teor de óleo essencial contido nesta planta encontra-se na faixa entre 1,5 e 3%, dependendo da região geográfica e da espécie. Normalmente, há variações consideráveis entre os constituintes majoritários de uma espécie para outra, principalmente pelo fato dos componentes do óleo essencial de *O. basilicum* serem produzidos por duas rotas bioquímicas diferentes: rota do ácido chiquímico e rota do ácido mevalônico (ÖZCAN; CHALCHAT, 2002). Na primeira (Figura 2), os maiores constituintes da espécie são estragol, eugenol, metileugenol e cinamato de metila, enquanto que na segunda (Figura 3) os componentes majoritários são linalol e geraniol (LAWRENCE et al., 1992).

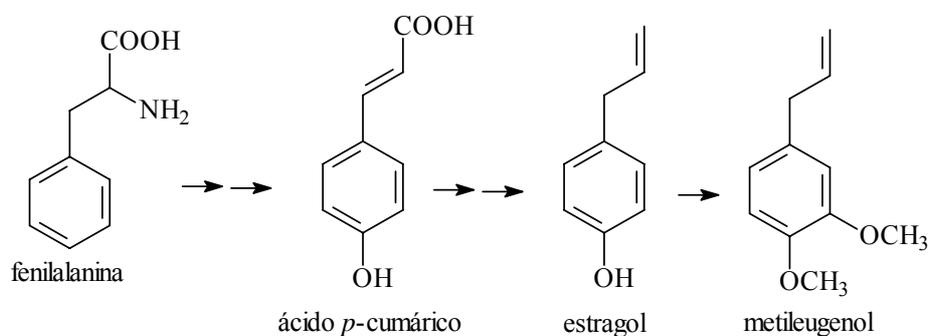


Figura 2 Biossíntese do estragol e metileugenol.
Fonte: Adaptado de Gang et al., 2002.

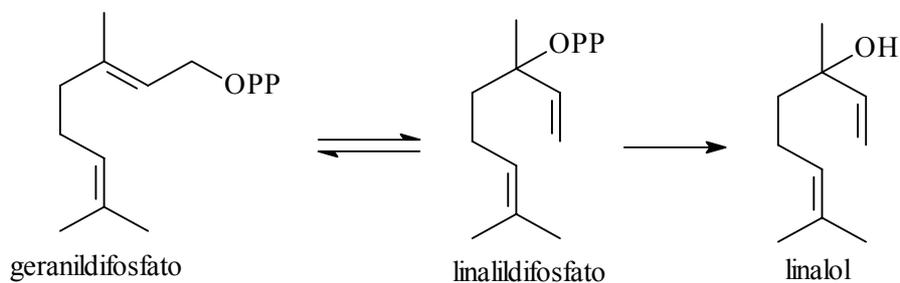


Figura 3 Biossíntese do linalol.
 Fonte: Adaptado de Dewik, 2009.

No caso do presente trabalho, foi utilizado a cultivar Maria Bonita, a qual apresenta como compostos majoritários o linalol, o geraniol e 1,8-cineol (BLANK et al., 2007) (Figura 4). O linalol é um monoterpene alcoólico terciário de cadeia aberta, produzido pela rota do ácido mevalônico. Pode ser encontrado normalmente sob a forma de uma mistura de isômeros de posição da primeira ligação dupla (SILVA et al., 2003).

Maria Bonita é o primeiro cultivar de manjeriço registrado no Registro Nacional de Cultivares pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Brasil, e foi obtida a partir do programa de melhoramento genético da Universidade Federal de Sergipe (BRITO et al., 2010).

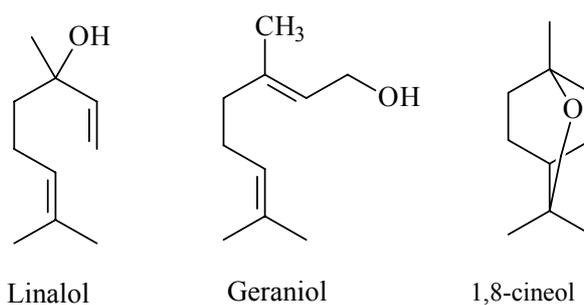


Figura 4 Estruturas químicas dos principais componentes monoterpênicos presentes na fração volátil de *Ocimum basilicum* L..

Estudos feitos por Rosado et al. (2009) para a mesma cultivar identificaram a presença de oito compostos, 1,8-cineol, linalol, geraniol, α -terpineol, acetato de geranila, α -*trans*-bergamoteno, γ -cadineno e epi- α -cadinol, sendo os componentes majoritários o linalol com 78,35% e geraniol com 15,95% concentração relativa.

2.1.2 *Mentha arvensis* L.

A *Mentha arvensis* L. (Figura 5), popularmente conhecida como hortelã-japonesa, menta-japonesa ou hortelã-doce, é uma planta medicinal e aromática. Assim como a maior parte das espécies medicinais cultivadas no mundo, é exótica, domesticada em seus ecossistemas naturais (MATTOS; INECCO, 2002).



Figura 5 Planta de *Mentha arvensis* L.

O cultivo industrial da *Mentha arvensis* é realizado em áreas subtropicais em vários países, tais como China, Índia, França, Estados Unidos e Brasil para a extração de seu óleo essencial (SRIVASTAVA et al., 2002).

O óleo essencial dessa espécie é constituído principalmente por monoterpenos, atribuindo-se a estes as funções de defesa da planta contra herbivoria, agentes antimicrobianos e alelopáticos (CARDOSO et al., 2001). O mentol e a mentona são os principais componentes do óleo e os de maior valor econômico, embora sejam conhecidos mais de 200 componentes presentes nos óleos do gênero *Mentha* (TAVISH; HARRIS, 2002).

Seus óleos essenciais são produzidos em glândulas especializadas presentes nas folhas e flores e constituem-se uma rica fonte de mentol. Os óleos essenciais das mentas e seus componentes são amplamente empregados em produtos aromatizantes de uso oral (MARTINS et al., 1994), tais como cremes dentais, antissépticos bucais, antiácidos, pastilhas refrescantes, gomas de mascar, licores e em cigarros (MOSCIANO, 2005).

Segundo Maia (1998), a biossíntese do mentol, segue uma sequência de rotas metabólicas até sua formação, ou seja, com a atuação da enzima limoneno 3-hidroxilase, responsável pelo acúmulo de mentol e que tem o limoneno como substrato, dará origem ao trans-isopiperitoneol, piperitona, mentona e mentol. Óleos essenciais com mais de 20% de mentona indicam que a mentona ainda não foi convertida em mentol. A conversão de mentona para mentol é um processo lento e está associado com o estágio de maturação e estado nutricional da planta (MURRAY et al., 1972).

Na síntese do óleo essencial de *Mentha piperita*, a (+)-pulegona é a precursora do mentol, considerado o componente mais significativo dos óleos de *Mentha* spp. Dependendo das condições ambientais, a (+)-pulegona pode reduzir a (-)-mentona e sintetizar mentol, através da pulegona redutase, ou oxidar a (+)-mentofurano, pela mentofurano sintase (MAHMOUD; CROTEAU, 2003) (Figura 6).

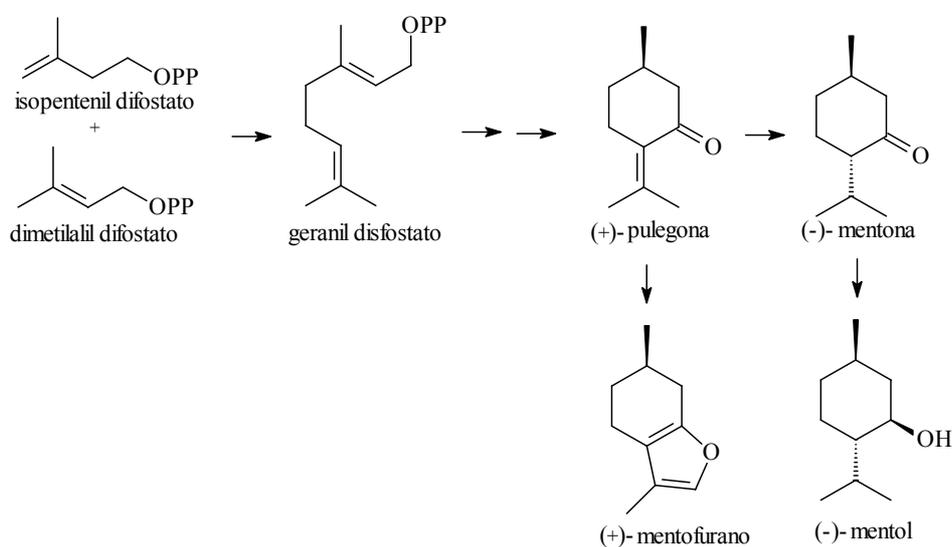


Figura 6 Rota metabólica do mentol.
 Fonte: Adaptado de Mahmoud; Croteau, 2003.

2.2 Cultura de tecidos vegetais

O cultivo *in vitro* pode ser empregado em diferentes espécies, inclusive as plantas medicinais e aromáticas, principalmente no que diz respeito na obtenção de genótipos produtores de compostos medicinais (COSTA et al., 2007). A regeneração de plantas através da cultura de tecidos baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, que em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para regenerar uma planta inteira (FLORES, 2006).

A cultura de tecidos se dá através do cultivo de fragmentos de tecidos vegetais chamados de explantes. Estes explantes podem ser de diferentes tipos e a escolha do material poderá influenciar todo o processo, resultando em sucesso ou fracasso (GEORGE, 2008). O tipo de explante, bem como a definição de seu estágio de desenvolvimento, é um dos fatores que determinam a capacidade de resposta *in vitro* (FREITAG et al., 2012) e a cultura de tecidos, apesar do alto

custo, proporciona a obtenção de milhares de mudas a partir de uma gema em pequeno intervalo de tempo e espaço (DIAS et al., 2011).

A morfogênese *in vitro*, caracterizada pela emergência e formação de novos órgãos, resulta da interação de processos de indução, competência, determinação e diferenciação celular, os quais são influenciados pelo genótipo, tipo e condições fisiológicas dos explantes, bem como da composição do meio de cultivo *in vitro* (LIU; PIJUT, 2008).

Uma das aplicações da cultura de tecidos vegetais é a micropropagação, técnica de grande uso e de resultados mais concretos. Engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da plântula (BASTOS et al., 2007). A micropropagação possibilita a multiplicação por via assexuada resultando em um grande número de descendentes. Genótipos superiores podem ser multiplicados sem modificação em sua estrutura genética (BERTOZZO; MACHADO, 2010). Segundo Titon et al. (2006), tem como vantagens a manutenção do genótipo e do fenótipo, conhecimento sobre mutações ou variedades genéticas selecionadas, excelente estado fitossanitário das plantas obtidas, rápida propagação clonal e produção em massa geneticamente idêntica e fisiologicamente uniforme.

A otimização de protocolos de micropropagação com êxito depende da elucidação de vários fatores diretamente envolvidos no processo. Dentre os tipos de explantes mais utilizados, as gemas apicais e axilares e os segmentos nodais, promovem clones "true-to-type", ou seja, idênticos à planta matriz e por isso são os mais indicados para a multiplicação e conservação *in vitro* de genótipos elites e a assepsia determinará a possibilidade ou não de continuação dos trabalhos, no que se refere à obtenção de culturas totalmente axênicas (SOUZA et al., 2011).

2.2.1 Meios de cultura

O sucesso do sistema de micropropagação é a conjugação de fatores nutritivos, ambientais e endógenos. No caso específico dos fatores ambientais, procura-se estudar os componentes do meio de cultura. Neste caso, diversas formulações de meios básicos (Tabela 1) têm sido utilizadas (VILLA et al., 2010). As concentrações de cada componente do meio de cultura são específicas para cada espécie. Varias modificações desses componentes são estabelecidas com intuito de promover melhorias no cultivo *in vitro* de plantas (LONDE et al., 2012).

Tabela 1 Concentração final dos meios de cultura MS, B5 e WPM.

COMPONENTES	MS	B5	WPM
	mg L ⁻¹		
NH ₄ NO ₃	1650	-	400
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	246	370
KNO ₃	1900	2528	-
KH ₂ PO ₄	170	-	170
K ₂ SO ₄	-	-	990
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150	96
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,2	37,2	37,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
H ₃ BO ₃	6,2	3	6,2
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,25
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	10	-
MnSO ₄ .H ₂ O	22,3	-	22,3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
KI	0,83	0,75	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	2	8,6
Concentração total de sais	4633,23	3289,05	2684,60
Concentração final de N	60,01 mM	26,75 mM	14,70 mM

Os minerais incluídos na maioria dos meios utilizados hoje foram definidos por White em 1951 e utilizados, durante anos, como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diferentes espécies. Meios de cultura são combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento, podendo ser sólidos (adicionando-se ágar ou outro agente para solidificação) ou líquidos, de acordo com o protocolo para o sistema de cultivo (CALDAS et al., 1998).

O estudo da composição dos sais minerais, suplementos orgânicos e o balanceamento e tipo de reguladores vegetais para a indução da diferenciação da parte aérea ou raiz das plantas (SANTOS et al., 2005). A composição do meio de cultura pode afetar vários fatores no cultivo *in vitro*, além disso, as técnicas de cultivo *in vitro* podem auxiliar vantajosamente no estudo da produção, acúmulo e metabolismo de importantes metabólitos secundários (PANAGIOTOPOULOS et al., 2000).

O meio básico MS de Murashige e Skoog (1962) foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio de White com extratos de folha de fumo, sendo utilizado na cultura de diversas espécies (CALDAS et al., 1998). O meio MS foi uma das primeiras formulações melhoradas utilizadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio, diferente do meio B5 (GAMBORG et al., 1968) que possui baixas concentrações de sais. Outro meio bastante utilizado é o Woody Plant Medium (WPM) elaborado por Loyd e McCown (1980), para propagação de plantas lenhosas.

Basicamente, o meio de cultura não fornece apenas macro e micronutrientes. Adicionalmente, visando o maior crescimento, incluem-se compostos orgânicos, como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento (BRONDANI et al., 2010). Dos componentes do meio de cultura, os carboidratos proporcionam uma fonte de energia ao explante, sendo a

sacarose o carboidrato mais comumente utilizado (CASTRO et al., 2010). Dentre os componentes do meio de cultura, a água é utilizada em maior quantidade, razão pela qual deve apresentar ótima qualidade. Impurezas presentes na água podem vir a afetar o desenvolvimento do explante *in vitro*, portanto, deve-se destilar e deionizar a água a ser empregada no preparo do meio de cultura (SANTOS, 2003).

Um dos fatores que pode ter maior influência na propagação *in vitro* é o uso de reguladores de crescimento, também chamados de fitorreguladores. Na micropropagação, sua influência já foi constatada em vários trabalhos, sendo essas substâncias, em muitos casos, indispensáveis ao bom desenvolvimento da cultura *in vitro*, tanto no estabelecimento, quanto em fases posteriores, no entanto, a resposta a esses reguladores de crescimento varia de acordo com a espécie cultivada, bem como com as classes, tipos e doses de fitorreguladores utilizadas (PINHAL et al., 2011).

A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender em necessidades específicas. Para isso, deve-se utilizar o meio apropriado que possibilite a concentração de sais de que a espécie necessita, bem como a concentração e o tipo de regulador de crescimento que aperfeiçoe o processo de multiplicação (RODRIGUES et al., 2013).

2.2.2 Produção *in vitro* de metabólitos secundários

A cultura de células vegetais vem sendo utilizada para a produção de compostos de interesse às indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (SHIM et al., 2010). Em plantas medicinais, a cultura de tecidos tem auxiliado na otimização da produção de metabólitos (ARIKAT, 2004). Os metabólitos secundários são essencialmente produzidos e extraídos a partir de plantas

cultivadas no campo sobre a influência de variações sazonais e a utilização de técnicas biotecnológicas apresenta-se como um recurso alternativo para a produção de fármacos (RODRIGUES; ALMEIDA, 2010).

Uma das estratégias para estudos sobre o controle metabólico de compostos secundários é o uso da regeneração de plântulas *in vitro*, através de cultura de brotos (VELLOSO et al., 2009). A cultura de células de plantas fornece uma série de vantagens sobre os estudos com plantas íntegras, incluindo a geração de material necessário para os estudos em torno de um ano, células indiferenciadas, estado de desenvolvimento das células relativamente uniforme, ausência da interferência de microrganismos; e mais importante, o ciclo vegetativo reduzido (CROTEAU et al., 2000).

A biossíntese dos metabólitos secundários e, conseqüentemente, dos princípios ativos em plantas medicinais e aromáticas depende de fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Assim, os fatores que influenciam as variações nas concentrações destes princípios em plantas devem ser avaliados, visando obter uma matéria-prima de melhor qualidade, já que a qualidade das plantas medicinais está relacionada ao seu teor de princípios ativos e, portanto, à sua eficácia terapêutica (FREITAS et al., 2004).

A cultura de tecidos possui condições controladas de temperatura, umidade e nutrição, fato capaz de manter durante o ano condições adequadas que viabilizem os estudos de metabólitos secundários.

O interesse pela fisiologia do estresse e seus efeitos no conteúdo de metabólitos secundários em plantas em parte é explicado por querer se conhecer as possíveis adaptações que poderiam ocorrer no metabolismo desses compostos, maximizando a produção de constituintes ativos de plantas medicinais e condimentares (VERPOORTE et al., 1999). Os fitoquímicos podem variar, tanto em qualidade, como em quantidade, em plantas cultivadas *in*

vivo e *in vitro*, como demonstrado por Lucchesini et al. (2009) em estudo com *Echinacea angustifolia* D.C.

Conforme Paulus et al. (2007), a quantificação dos componentes existentes nos óleos essenciais tem sido bastante utilizada para avaliação da qualidade dos óleos essenciais. Os principais componentes químicos do óleo essencial são obtidos submetendo-se uma amostra de óleo à análise cromatográfica associada à espectrometria de massas. Uma técnica que pode ser empregada em cultura de tecidos devido ao baixo peso de amostra que necessita é a de *headspace* estático, sendo relativamente simples e de fácil operação, ela tem sido desenvolvida para melhorar a eficiência da extração para compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de amostras líquidas e sólidas (MARTINEZ et al., 2002).

REFERÊNCIAS

ARIKAT, N. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 100, n. 1-4, p. 93-202, Mar. 2004.

BASTOS, L. P. MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P.C.; ROCHA, M. C. ; HANSEN, D. S.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C.V. L.; SOUSA, C. S. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1122-1124, 2007. Supl.

BERTOZZO, F; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, nov./dez. 2010.

BIZZO, H. R., HOVELL, M. C., REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.

BLANK, A. F.; SOUZA, V. M. de; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; PAULA, J. W. A. de; ALVES, P. B. Novas cultivares Maria Bonita cultivar de manjeriço tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 12, p. 811-1813, dez. 2007.

BOONSNONGCHEEP. P.; KORSANGRUANG, S.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHINTAPAKORN, Y.; SARALAMP, P.; PRATHANTURARUG, S. Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, Dordrecht, v. 101, n. 2, p. 119-126, May, 2010.

BRITO, A. C.; SOUZA, J. D.; REBOUÇAS, T. N. H.; AMARAL, C. L. F. Propriedades do pólen e do estigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência de cruzamentos em programas de melhoramento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 208-214, 2010.

BRONDANI, G. E.; HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; WENDLING, I. Desinfestação e meio de cultura para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua*. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 40, n. 3, p. 541-554, set./dez. 2010.

BRUNI, R.; SACCHETTI, G. Microorganism-plant interactions as influencers of secondary metabolism in medicinal plants. **Minerva Biotecnologica**, Turim, v.17, n. 3, p.119-125, Sept. 2005.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p. 87-132.

CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; DELÚ FILHO, N.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral química e medicinal**. Lavras: UFLA, 2001. 81 p.

CASTRO, L. M. de; MOURAO FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J.; MIYATA, L. Y. Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1831-1834, 2010.

CHANG, J. H.; SHIN, J. H.; CHUNG, L.S.; LEE, H. J. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, n. 12, p. 1097-1099, Dec. 1998.

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 68-72, jan. 2007.

COUTO, M. E. O. **Coleção de plantas medicinais aromáticas e condimentares**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 91p.

CROTEAU, R. B.; DAVIS, E. M.; RINGER, K. L.; WILDUNG, M. R. Menthol biosynthesis and molecular genetics. **Naturwissenschaften**, New York, v. 92, n.12, p. 562-577, Dec. 2005.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1250-1318.

DIAS, M. M.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A. G.; SANTOS, V. A. dos; OLIVEIRA, A. C. de; RODRIGUES, V. A. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento *in vitro* de ananás do campo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 513-520, 2011.

DEWIK, P. M. **Medicinal Natural Product: a biosynthetic approach**. 3.ed. United Kingdom: Wiley, 2009. 539p.

FAVORITO, P. A.; ECHER, M. M.; OFFEMANN, L. C.; SCHLINDWEIN, M. D.; COLOMBARE, L. F.; SCHNEIDER, R. P.; HACHMANN, T. L. Características produtivas do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função do espaçamento entre plantas e entre linhas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.1 3, p. 582-586, 2011. Especial.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de b-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FREITAG, Â. S.; NERY, F. U.; ROSSI, F. R.; GONÇALVES, A. N. Estudo comparativo entre dois meios de cultura para *Corymbia citriodora in vitro*. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 42, n. 2, p. 347-354, jun. 2012.

FREITAS, M. S. M.; MARTINS, M. A.; VIEIRA, I. J. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 9, p. 887-894, set. 2004.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GANG, D. R.; LAVID, N.; ZUBIETA, CHLOE; CHEN, F.; BEUERLE, T.; LEWINSOHN, E.; NOEL, J. P.; PICHERSKY, E. Characterization of Phenylpropene O -Methyltransferases from Sweet Basil: Facile Change of Substrate Specificity and Convergent Evolution within a Plant O - Methyltransferase Family. **The Plant Cell**, v. 14, p. 505-519, February, 2002.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 1-28.

GOPI, C.; SEKHAR, N.; PONMURUGAN, P. *In vitro* multiplication of *Ocimum gratissimum* L. through direct regeneration. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 9, p. 723-726, May, 2006.

LAWRENCE, B. M. Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. (Ed.). **In Advances in labiatae science**. Kew: The Royal Botanic Gardens, 1992.

LIU, X.; PIJUT, P. M. Plant regeneration from *in vitro* leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 94, n. 2, p. 113-123, Aug. 2008.

LOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Proceedings-International Plant Propagators Society**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

LONDE, L. N.; ALVES, K. A.; RIBEIRO, E. B. Efeito de concentrações de sacarose e de meio de cultura sobre a taxa de crescimento de mandioca variedade BGM 0116 conservadas *in vitro*. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, São Luiz, v. 6, n. 2, p. 67, 2012

LUCCHESINI, M.; BERTOLI, A.; MESUALI-SODI, A.; PISTELLI, L. Establishment of *in vitro* tissue cultures from *Echinacea angustifolia* D.C. adult plants for the production of phytochemical compounds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 484-490, Oct. 2009.

MAIA, N. B. Efeito da nutrição mineral na qualidade do óleo essencial da menta (*Mentha arvensis*) Cultivada em solução nutritiva. In: MING, L.C. **Plantas medicinais aromática e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. p. 81-96.

MARTINEZ, E.; LACORTE, S.; LLOBET, I.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Multicomponent analysis of volatile organic compounds in water by automated purge and trap coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 959, n. 1/2, p.181- 190, jun. 2002.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 220 p.

MATKOWSKI, A. *In vitro* isoflavonoid production in callus from different organs of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi. J. **Journal. Plant Physiol**, Jena, v. 161, n 3, p. 343-346, Mar. 2004.

MATTOS, S. H.; INNECO, R. Idade ideal de corte da *Mentha arvensis* L. como produtora de óleo essencial e mentol para o Estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 15-18, 2002.

MAZUTTI, M.; BELEDELLI, B.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Caracterização química de extratos de *Ocimum basilicum* L. obtidos através de extração com CO₂ a altas pressões. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1198-1202, out./dez. 2006.

MISHARINA, T. A. Influence of the duration and conditions of storage on the composition of the essential oil from coriander seeds. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 622-628, June 2001.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14481-14486, 2003.

MOSCIANO, G. Organoleptic characteristics of flavor materials. **Perfumer & Flavorist**, Wheaton, v. 30, n. 4, p. 52-6, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

MURRAY, M. J.; FAAS, W.; MARBLE, P. Chemical composition of *Mentha arvensis* var. *piperascens* and four hybrids with *Mentha crispa* harvested at different times in Indiana and Michigan. **Crop Science**, Madison, v.12, n. 6, p.742- 745 , Dec. 1972.

NITZSCHE, A.; TOKALOV, S.V.; GUTZEIT, H.O.; LUDWIG-MÜLLER, J. Chemical and biological characterization of cinnamic acid derivatives from cell cultures of lavender (*Lavandula officinallis*) induced by stress and jasmonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n.10, p. 2915-2923, May 2004.

NOGUEIRA, J. M. F.; ROMANO, A. Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 13, n.1, p. 4-7, Jan./Feb. 2002.

ÖZCAN, M.; CHALCHAT, J. C. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. **Czech Journal Food Science**, Prague, v. 20, n. 6, p. 223–228, 2002.

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 Genus Salvia**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000.

PAULUS, D.; MEDEIROS, S. L. P.; SANTOS, O. S.; MANFRON P. A.; PAULUS, E.; FABBRIN, E. Teor e qualidade do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) produzida sob cultivo hidropônico e em solo. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 9, n. 2, p.80-87, 2007.

PHATAK, V. S.; HEBLE, M. R. Oraganogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 73, n.1, p. 32-39, Feb. 2002.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P. SILVA, V. J. da; MORAIS, T. P. de; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p.1136-1142, jul. 2011.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 20, n. 2 p. 101-153, May 2002.

REIS, A.; MIRANDA, B. E. C.; BOITEUX, L. S.; HENZ G. P. Murcha do manjeriçao (*Ocimum basilicum*) no Brasil: agente causal, circulo de plantas hospedeiras e transmissão via semente. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 137-141, jun. 2007.

RIBEIRO, M. de F.; DONINI, L.; P. SOUZA, J. A.; GUISSO, A. P.; FERREIRA-MOURA, I.; BOBROWSKI, V. L.; VIÉGAS, J. Influência de diferentes concentrações de sais de MS e açúcares no cultivo *in vitro* de manjeriçao roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n.1, p. 57-59, 2007.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 333-340, 2010.

RODRIGUES, F. A.; PENONI, E. dos S.; SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 77-82, 2013.

ROSADO, L. D. S.; RODRIGUES, H. C. A.; PINTO, J. E. B. P.; CUSTÓDIO, T. N.; PINTO, L. B. B.; BERTOLUCCI, S. K. V. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjeriço "Maria Bonita" na germinação de alface, tomate e melissa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p.422-428, 2009.

SANTOS, E. K. dos. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 415-444.

SANTOS, A. S. A.; MACHADO, I. S.; LEÃO, A. L.; RAMOS, A. A. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith): a influência das citocininas sintéticas na cultura de tecido. **Revista de Biotecnologia-Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 8, n. 35, p.62-65, jul. 2005.

SHIM, K. M. et al. Accumulation of cell biomass anthraquinones, phenolics, and flavonoids as affected by auxin, cytokinin, and medium salt strength in cell suspension culture of *Morinda citrifolia*. **Korean Journal of Horticultural Science & Technology**, Suwon, v. 28, n. 2, p. 288-294, apr. 2010.

SILVA, D. D. da; CHIERICE, G. O.; GALHIANE, M. S.; CHAAR, J. da S.; MOUCHREK FILHO, V. E. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* Korstermans utilizando uma nova coluna capilar POLYH4-MD em cromatografia gasosa. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 461-465, 2003.

SOUZA, A. V. de; BERTONI, B. W.; FRANCA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Griseb. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 92-98, jan./fev. 2011.

SRIVASTAVA, R. K.; SINGH, A. K.; KALRA, A.; TOMAR, V. K. S.; BANSAL, R. P.; PATRA, D.D.; CHAND, S.; NAQVI, A. A.; SHARMA, S.; KUMAR, S. Characteristics of menthol mint *Mentha arvensis* cultivated on industrial scale in the Indo-Gangetic plains. **Industrial Crops and Products**, Pradesh, v. 15, n. 3, p. 189-198, May, 2002.

TAVISH, H. M.; HARRIS, D. **An economic study of essential oil production in the UK: a case study comparing non-UK lavender/lavandin production and peppermint/spearmint production with UK production techniques and costs.** Edinburg: For the Government Industry, Forum for Non-Food Crops. The Scotch Parliament, 2002.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the minicutting and micro-cutting techniques. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 71, p. 109-117, 2006.

VANISREE, M.; LEE, C.-Y.; LO, S.-F.; NALAWADE, S. M.; LIN, C. Y.; TSAY H.S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin Academia Sínica**, Taipei, v. 45, n. 1 p. 1-22, Jan. 2004.

VELLOSO, M. A. L.; ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo *in vitro*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 267-272, jun. 2009.

VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, Oxford., v. 1, p. 13-25, 2002.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; TEN HOOPEN, H.J.G.; MEMELINK, J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 21, n. 6p. 467-479, June 1999.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SOUZA, A. das G.; VILELA, X. M. de S. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 109-117, 2010.

CAPÍTULO 2
Crescimento e produção *in vitro* de compostos voláteis de *Ocimum basilicum*
L. sob a influência de fatores químicos

RESUMO

O manjeriço é uma planta aromática e medicinal pertencente à família Lamiaceae de grande interesse econômico devido ao seu óleo essencial. Objetivou-se identificar as condições mais adequadas de cultivo *in vitro* que possibilitem melhor crescimento da planta e produção de constituintes voláteis nas folhas de *Ocimum basilicum*. Para isso, foram realizados seis experimentos: diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM); diferentes concentrações do meio MS (2MS, MS, ½MS e ¼MS); orientação de inoculação (vertical e horizontal) dos explantes, diferentes reguladores de crescimento (auxinas e citocininas), estágio de desenvolvimento do explante e comparação da fração volátil entre a planta matriz, aclimatizada e cultivada *in vitro*. O meio MS normal é o mais indicado para o crescimento *in vitro* de *O. basilicum*. O segmento nodal inoculado na orientação horizontal propicia maior crescimento das plântulas. O estragol foi o constituinte mais abundante em plântulas de *O. basilicum* cultivadas *in vitro*. O uso de auxinas isoladas possibilita o maior crescimento da plântula *in vitro*, sendo o ANA responsável pelo maior aumento dos teores de linalol. Para as variáveis analisadas houve um comportamento crescente dos valores no decorrer de 100 dias, porém plântulas de *O. basilicum* devem permanecer por até dois meses em um mesmo meio de cultura, tanto para seu crescimento quanto para a obtenção de maiores teores de linalol. Há diferenças quantitativas e qualitativas da fração volátil entre a planta matriz, plantas aclimatizadas e cultivadas *in vitro*.

Palavras-chave: Manjeriço. Planta medicinal. Micropropagação. Linalol.

ABSTRACT

Basil is an aromatic and medicinal plant belonging to the Lamiaceae family of great economic interest due to its essential oil. The aim of this research was to study *in vitro* culture conditions for plantlet growth and volatile constituent production in the leaves of *Ocimum basilicum*. Six experiments were investigated: different culture media (MS, B5 and WPM); different MS salt concentration (2MS, MS, MS ½ and ¼ MS); different segments and explant orientation (2MS, MS, MS ½ and ¼ MS); different growth regulators (auxins and cytokinins); developmental stage of the explant and comparison of the volatile fraction among mother plant, acclimatized and plantlet. The MS medium without fractionation is the most suitable for the *in vitro* growth of *O. basilicum*. The nodal segments inoculated in horizontal orientation provide greater plantlet growth. The estragole was the most abundant compound in *O. basilicum* plantlet cultured *in vitro*. The auxin enhancement plantlet growth and NAA gave highest levels of linalool. There was an increase in parameters analyzed during 100 days of culture and plantlet should remain in culture for two months for growth and achieve higher levels of linalool. There are quantitative and qualitative differences among the volatile fraction of the mother plant, plants acclimatized and cultured *in vitro*.

Keywords: Basil. Medicinal plant. Micropropagation. Linalool.

1 INTRODUÇÃO

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), pertencente à família Lamiaceae, é uma planta anual ou perene, dependendo do local em que é cultivado. Essa espécie é comercialmente cultivada para utilização de suas folhas aromáticas, as quais são usadas frescas ou secas como aromatizante ou tempero (BLANK et al., 2005). O óleo essencial do manjeriço pode ser extraído de folhas e ápices que possuam inflorescências, comumente este processo é realizado por meio de hidrodestilação para obtenção de linalol (FAVORITO et al., 2011).

Segundo Blank et al. (2007) o óleo essencial de manjeriço da cultivar Maria Bonita apresenta elevado rendimento comparado a outras cultivares e possui substâncias de importância econômica, terapêutica e condimentar, como linalol, geraniol e 1,8-cineol. O linalol vem ganhando espaço na agricultura devido à suas propriedades antimicrobianas, inseticidas e repelentes, sendo assim largamente usado como composto de partida para várias sínteses importantes, como a do acetato de linalila, sendo muito útil em operações curativas, preventivas e na conservação de grãos (FERNANDES et al., 2004).

Uma das estratégias para estudos sobre o controle metabólico de compostos secundários é o uso da regeneração de plântulas *in vitro*, através de cultura de brotos (VELLOSO et al., 2009). Os metabólitos secundários são essencialmente produzidos e extraídos a partir de plantas cultivadas no campo sobre a influência de variações sazonais. A utilização de técnicas biotecnológicas apresenta-se como um recurso alternativo para a produção de fármacos (NAVROSKI et al., 2012).

No Brasil, o manjeriço é cultivado principalmente por pequenos produtores para a comercialização das folhas, podendo ser propagado de maneira sexuada e assexuada, sendo que a propagação vegetativa é uma importante ferramenta que vem sendo amplamente utilizada visando manter

variedades de importância econômica e medicinal (SILVA et al., 2012; EHLERT et al., 2004). Dentre essas técnicas, destaca-se a cultura de tecidos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de metabólitos secundários com o crescimento celular (RODRIGUES; ALMEIDA, 2010).

Cultura de células e tecidos vegetais vem sendo utilizadas como opções ao uso da planta íntegra para o estudo e a produção de diversos metabólitos secundários (OLIVEIRA et al., 2009). Alguns trabalhos têm demonstrado o efeito de micronutrientes na morfogênese *in vitro* e na produtividade de metabólitos secundários (AKITA et al., 2002; KUMAR et al., 2004). Diversos critérios são importantes para o estabelecimento de cultivos *in vitro*, entre eles estão o tipo de meio de cultura, seguido do suplemento de reguladores de crescimento, tipo de explante, entre outros (ZHANG et al., 2003), sendo necessário encontrar as condições mais adequadas para cada espécie que se pretende propagar e levar em conta que esses critérios podem afetar diretamente a produção de metabólitos secundários.

Existem formulações distintas que devem ser ajustadas para cada espécie, sendo o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e suas diluições, costumeiramente, as mais utilizadas. Estudo realizado por Reis et al. (2009), mostrou que tanto o teor quanto a composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* foram influenciados pela concentração de sais do meio MS.

A suplementação de reguladores vegetais no meio de cultura também interfere diretamente no crescimento das plântulas. As auxinas e citocininas são substâncias reguladoras essenciais para o desenvolvimento dos explantes e estão intimamente relacionadas com a divisão celular e o crescimento do meristema (CHAGAS et al., 2004). Segundo Silva et al. (2005) a adição de reguladores de crescimento podem estar associados ao aumento do conteúdo de metabólitos secundários devido ao fato de os reguladores estimularem o desenvolvimento vegetal.

Com base no exposto, objetivou-se investigar diferentes condições de cultivo *in vitro*, a fim de determinar um método eficiente de micropropagação e de produção de constituintes voláteis de *O. basilicum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA, em Lavras-MG.

2.1 Fase de estabelecimento

Sementes de *O. basilicum* cv. Maria Bonita (PI197442-S3- bulk 13) de plantas matrizes do Horto de Plantas Medicinal do DAG/UFLA foram coletadas e semeadas em substrato comercial em bandeja de isopor com 128 células. O material de propagação foi posto em casa de vegetação até produzirem número suficiente de explantes que possibilitasse o início do estabelecimento.

Segmentos nodais foram utilizados como explantes para estabelecer as culturas primárias. Os segmentos foram cortados em tamanho aproximado de 1 cm com o auxílio de uma lâmina e lavados abundantemente com água corrente e sabão neutro. Em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50% e mantidos sob agitação constante, por 15 minutos, seguido de cinco lavagens em água destilada e autoclavada, sob capela de fluxo laminar.

Após a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 15 g/L de sacarose com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16

h luz/8 h escuro, sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Depois de estabelecidas, as plântulas foram multiplicadas no mesmo meio do estabelecimento e mantidas nas mesmas condições de cultivo para formação de um estoque de plântulas que foram usadas nos experimentos.

Plântulas estabelecidas *in vitro* em meio de cultura $\frac{1}{2}\text{MS}$ com 40 dias foram utilizadas como fonte de explante para a realização dos experimentos.

2.2 Condições gerais dos experimentos

Foram realizados 6 experimentos descritos a seguir. Para todos os experimentos foram seguidas as mesmas condições de cultivo. O meio de cultura foi solidificado com 6 g/L de ágar, o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Após o preparo, o meio foi autoclavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Depois da inoculação, os tubos foram fechados com tampas plásticas e vedados com parafilme, mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro, sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Aos 40 dias foram avaliados o número de folhas, nós; número, altura (cm) e biomassa seca das brotações (mg); número, comprimento (cm) e biomassa seca de raiz (mg), assim como a análise química da fração volátil das folhas. A altura da brotação e o comprimento das raízes foram determinados com o auxílio de uma régua. Para a altura, a medição foi feita da base da brotação até a gema apical. Para a determinação da biomassa seca, as brotações e as raízes foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a 40°C , por 5 dias. Após esse período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

2.2.1 Diferentes meios de cultura

Segmentos nodais com 1 cm foram inoculados em 3 meios de cultura: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG et al., 1968) e WPM (LOYD; MCCOWN, 1980).

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições, sendo 4 tubos por repetição, com um segmento nodal por tubo.

2.2.2 Variações da concentração dos sais do meio básico MS

Segmentos nodais com 1 cm foram inoculados em quatro variações do meio MS: o dobro das concentrações dos sais do MS (2MS), MS na sua formulação original (MS), metade da concentração dos sais do MS ($\frac{1}{2}$ MS) e um quarto da concentração dos sais do MS ($\frac{1}{4}$ MS). Todas as variações do MS foram suplementadas com 30 g/L de sacarose.

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições, sendo 4 tubos por repetição, com um segmento nodal por tubo.

2.2.3 Orientação de inoculação do segmento nodal

Os segmentos nodais com tamanho de 1,0 cm foram cultivados em meio básico MS suplementado com 30 g/L de sacarose. O segmento foi inoculado na posição vertical e horizontal.

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições, sendo 4 tubos por repetição, com um segmento nodal por tubo.

2.2.4 Efeito dos reguladores de crescimento

Segmentos nodais com 1 cm foram inoculados em meio básico MS suplementado com 30 g/L e diferentes reguladores de crescimento: 1) controle (ausência de reguladores), 2) AIA + BAP, 3) AIB + BAP, 4) ANA + BAP, 5) AIA + TDZ, 6) AIB + TDZ, 7) ANA + TDZ, 8) TDZ, 9) BAP, 10) AIA, 11) AIB e 12) ANA, sendo as auxinas e citocininas nas concentrações de 0,5 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹ respectivamente, totalizando 12 tratamentos.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo 13 tubos por repetição, com um segmento nodal por tubo. Para este experimento também foi avaliada a porcentagem de calogênese, bem como a biomassa seca dos calos.

2.2.5 Estádio de desenvolvimento do explante

Segmentos nodais de plântulas estabelecidas foram utilizados para o fornecimento do explante. Os segmentos nodais foram cultivados em meio básico MS suplementado com 30 g/L de sacarose sem adição de reguladores de crescimento.

Para a determinação da análise de crescimento foram realizadas avaliações de crescimento em intervalos de 10 dias até o 100º dia de cultivo.

2.2.6 Produção de constituintes voláteis na planta matriz, plântula *in vitro* e aclimatizada

A produção de constituintes voláteis da planta matriz, plântula *in vitro* e aclimatizada foram comparadas qualitativa e quantitativamente.

A planta matriz foi cultivada em canteiros a pleno sol e suas folhas foram coletadas logo após a floração. Plântulas de 60 dias com o sistema radicular desenvolvido foram retiradas dos tubos de ensaio e cuidadosamente lavadas com água corrente, para eliminar os resíduos do meio de cultura. Em seguida, foram transplantadas para bandejas com substrato comercial. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com nebulização intermitente, temperatura mantida em torno de 26 °C e sombreamento parcial obtido com sombrite de 70% de sombreamento por 15 dias. Logo após esse período foram transferidas para outra casa de vegetação sem sombrite e com sistema de fertirrigação (Quadro 1). Após 60 dias as folhas foram coletadas para a avaliação da fração volátil.

Para a avaliação *in vitro*, plântulas com 40 dias cultivadas em meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose foram analisadas.

Componente	g/250 L
Nitrato de Cálcio	190
Sulfato de Amônia	56,25
MAP	27,5
Cloreto de Potássio	100
Sulfato de Magnésio	93,75
Tenso Ferro	11
Sulfato de Manganês	1,68
Ácido Bórico	0,82
Sulfato de Zinco	0,14
Sulfato de Cobre	0,09
Molibdato de Sódio	0,0125

Quadro 1 Solução de fertirrigação.

2.3 Análises químicas da fração volátil

Para extração da fração volátil empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System* (CTC Analytics AG, Switzerland) acoplado ao

sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais, estabeleceram-se 30 min de incubação das amostras a 110 °C e a temperatura da seringa foi programada para 120 °C. Folhas foram coletadas de plântulas cultivadas *in vitro* e secas em estufa de circulação de ar a 40 °C. Aliquotas de 90 mg de folhas secas, em duplicatas, que foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE até a análise; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica.

As análises químicas da fração volátil foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z*.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA).

O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e da linha de transferência para o MS foram mantidas em 230 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 4 °C/min até 130 °C e, em seguida, de uma rampa de 10 °C/min até 250 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As concentrações dos constituintes presentes na fração foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos do cromatograma total de íons.

Os componentes foram identificados por comparação de seus índices de retenção relativos calculados com índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007).

Os índices de retenção (IR) foram calculados através da coinjeção com a mistura de hidrocarbonetos, C₈-C₂₀ (Sigma, EUA), e com a aplicação da equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

2.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diferentes meios de cultura

A concentração de sais pode estimular o crescimento celular ou podem ser muito salino para algumas espécies na fase de crescimento. Os explantes foram cultivados em diferentes meios de cultura para testar o melhor meio de estabelecimento. O meio B5 contém em sua composição 3,28 g/L de sais; o WPM 2,68g/L e o MS 4,63g/L. Em relação à concentração de nitrogênio o B5 contém 26,75 mM; o WPM 14,70 mM e o MS 60,01 mM.

Dentre os diferentes meios de cultura avaliados, o meio MS obteve maior ganho de biomassa seca de brotação não sendo muito salino para esta espécie (Tabela 1). O nitrogênio é um elemento mineral muito importante para o crescimento do explante por ser um elemento essencial para a formação de aminoácido, ácidos nucleicos, etc. Plântulas cultivadas nos meios com maior concentração de nitrogênio (MS e B5) obtiveram maior altura. Para os parâmetros número de folhas, nós e brotos não houve diferença (Tabela 1).

A menor concentração de sais num meio de cultura pode favorecer o crescimento radicular (COUTO et al., 2003). Neste caso a menor concentração não foi a que estimulou maior crescimento radicular (Tabela 1). Dos meios utilizados, observou-se que o WPM foi o menos eficiente para formação do sistema radicular adventício (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 Média do número de folhas (NF), nós (NN); número (NB), altura (AB), biomassa seca das brotações (BSB); número (NR), comprimento (CR) e biomassa seca de raiz (BSR) de *O. basilicum* em diferentes meios de cultura aos 40 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Meios de cultura	NF	NN	NB	AB (cm)	BSB (mg)	NR	CR (cm)	BSR (mg)
MS	20 a	3 a	3 a	4,47 a	31,01 a	4 b	2,53 a	5,07 a
B5	20 a	3 a	3 a	4,54 a	23,13 b	6 a	2,84 a	7,36 a
WPM	16 a	3 a	2 a	3,84 b	19,15 b	4 b	1,99 b	3,79 b
CV	14,66	14,73	15,07	21,92	16,12	16,03	25,26	30,23

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Em estudos de cultura de tecidos, identificar o melhor meio de cultivo para a espécie em questão é de grande relevância para o sucesso do cultivo *in vitro*. O meio básico MS, apesar da sua elevada concentração de sais, é o meio que possibilita melhor crescimento de diversas espécies. Disarz e Corder (2009) trabalhando com diferentes meios observaram que o meio MS promoveu melhor crescimento em explantes de *Acacia mearnsii* de Wild., assim como em *Melia azedarach*, em que sobressairam-se os efeitos positivos do meio MS, com sua constituição completa de sais, ao serem testados os meios MS, ½ MS, WPM e B5 (HUSAIN; ANIS, 2009).



Figura 1 Plântulas de *O. basilicum* cultivadas *in vitro* em diferentes meios de cultura aos 40 dias. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Nas plântulas de *O. basilicum* cultivadas nos diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM) foram identificados 23 constituintes químicos perfazendo 97% da composição química total da fração volátil (Tabela 2). Não foram observadas diferenças químicas quantitativas e qualitativas significativas entre a fração volátil das plântulas cultivadas nos diferentes meios de cultura.

Tabela 2 Constituição química da fração volátil de plântulas de *O. basilicum* no cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM). UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	MS	B5	WPM
		Área % ± DP	Área % ± DP	Área % ± DP
mirceno	990	nd	0,35 ± 0,05	0,41 ± 0,14
octanal	1003	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,34 ± 0,01
1,8-cineol	1031	8,07 ± 0,96	7,86 ± 1,12	9,40 ± 0,65
ocimeno	1046	1,27 ± 0,21	1,42 ± 0,26	1,96 ± 0,46
γ-terpineno	1067	0,21 ± 0,05	0,18 ± 0,04	0,22 ± 0,03
terpinoleno	1089	0,71 ± 0,19	0,54 ± 0,04	0,73 ± 0,12
linalol	1101	7,35 ± 4,77	5,72 ± 2,07	6,62 ± 3,04
cânfora	1145	0,43 ± 0,09	0,35 ± 0,05	0,38 ± 0,01
<i>p</i> -ment-1-en-8-ol	1168	0,08 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,07 ± 0,02
estragol	1202	74,74 ± 5,74	74,55 ± 3,67	69,24 ± 1,28
acetato de fenchila	1221	0,20 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,24 ± 0,01
neral	1242	0,10 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,13 ± 0,05
geranial	1272	0,11 ± 0,05	0,07 ± 0,04	0,15 ± 0,06
acetato de bornila	1287	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,02
geranato de metila	1325	0,09 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,02
b-cubebeno	1393	0,06 ± 0,02	tr	0,13 ± 0,02
metileugenol	1407	1,02 ± 0,37	3,97 ± 1,25	4,03 ± 2,20
b-cariofileno	1424	0,93 ± 0,04	0,64 ± 0,07	0,81 ± 0,04
a-bergamoteno	1441	1,81 ± 0,42	1,51 ± 0,15	1,68 ± 0,15
a-humuleno	1459	0,40 ± 0,03	0,22 ± 0,07	0,33 ± 0,07
germacreno D	1486	0,35 ± 0,13	0,20 ± 0,10	0,21 ± 0,11
t-cadineno	1518	0,22 ± 0,05	0,12 ± 0,08	tr
t-cadinol	1548	0,22 ± 0,00	0,12 ± 0,03	0,16 ± 0,1
Total identificado (%)		98,61	98,36	97,38
Número de Compostos		22	23	23

^aÍndice de retenção relativo a série *n*-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

DP: desvio padrão (*n* = 2); nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%).

O óleo essencial de *O. basilicum* possui altas proporções de derivados fenólicos, tais como o eugenol e estragol, frequentemente combinado com diferentes proporções de linalol, um monoterpene (LEWINSOHN et al., 2000). No entanto, *O. basilicum* Maria Bonita é uma cultivar de manjerição desenvolvida para conter elevados teores de linalol (≥ 80%) (BLANK et al., 2007).

Os 3 constituintes de maior teor estão na Tabela 3. As folhas de plântulas de *O. basilicum* apresentaram teores de linalol abaixo do esperado (7,35% - MS; 5,72% - B5 e 6,62% - WPM). Em contrapartida, o constituinte majoritário das plântulas foi o estragol, com teores de 74,74% para o MS, 74,55% para o meio B5 e 69,24% para o WPM.

De acordo com Lewinsohn et al. (2000), a biossíntese desses constituintes está relacionada com as concentrações e atividades de enzimas chaves das vias biossintéticas. Esses autores evidenciaram que folhas jovens de *O. basilicum* apresentaram elevados níveis de atividade da chavicol O-metiltransferase, mas a atividade foi insignificante nas folhas mais velhas, indicando que a O-metilação de chavicol, para biossintetizar o estragol, ocorre principalmente durante o desenvolvimento precoce da folha.

Quanto ao 1,8-cineol observaram-se teores entre 7,86% a 9,40%, o quais corroboram com aqueles relatados por Blank et al. (2007) para a cultivar Maria Bonita (8,77%).

Tabela 3 Teores de três constituintes da fração volátil em plântulas *in vitro* de *O. basilicum* cultivadas em diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM). UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	MS	B5	WPM
		Área %	Área %	Área %
1,8-cineol	1031	8,07 ± 0,96	7,86 ± 1,12	9,40 ± 0,65
linalol	1101	7,35 ± 4,77	5,72 ± 2,07	6,62 ± 3,04
estragol	1202	74,74 ± 5,74	74,55 ± 3,67	69,24 ± 1,28
Total identificado (%)		90,16	88,13	85,26

^aÍndice de retenção relativo a série *n*-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

3.2 Variações da concentração dos sais do meio básico MS

O meio de cultura MS é o mais usado na cultura de tecido, do qual muitas variações de meios têm sido desenvolvidas. É um meio muito rico em sais e pode afetar o crescimento das espécies. Para avaliar as respostas de

crescimento e produção da fração volátil de *O. basilicum* avaliaram-se diferentes concentrações de sais do meio MS no crescimento do segmento nodal.

O meio MS na sua formulação original bem como na metade da concentração dos sais estimulou o crescimento do explante (Tabela 4). A concentração de 30 e 60 mM de nitrogênio estimulou o crescimento do explante, no entanto, uma diminuição (15 mM) ou aumento (120 mM) das concentrações afetou no crescimento do explante (Tabela 4 e Figura 2).

Estudos revelaram que a variação na composição química do meio básico MS influencia significativamente no crescimento das espécies (RIBEIRO et al., 2007; ASSIS et al., 2012). Para cada espécie o equilíbrio de sais no meio de cultura é fundamental para a boa nutrição da plântula *in vitro*. Normalmente, baixas concentrações de sais estimulam o enraizamento das espécies (GOLLE et al., 2012; SORACE et al., 2008). Para *O. basilicum* não foi diferente, sendo o ½MS responsável pelo maior incremento de biomassa seca. Nesta espécie altas concentrações de sais inibiram o sistema radicular (Tabela 4).

Tabela 4 Média do número de folhas (NF), nós (NN), número (NB), altura (AB), biomassa seca das brotações (BSB), número (NR), comprimento (CR) e biomassa seca de raiz (BSR) de *O. basilicum* nas variações do meio MS aos 40 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Variações do MS	NF	NN	NB	AB (cm)	BSB (mg)	NR	CR (cm)	BSR (mg)
2MS	14 b	2 b	2 a	1,3 b	8,2 c	0 c	0,0 c	0,0 c
MS	23 a	3 a	2 a	5,3 a	28,5 a	6 a	2,1 a	3,0 b
½MS	20 a	4 a	2 a	5,1 a	24,5 b	5 a	2,7 a	7,0 a
¼MS	10 c	2 b	2 a	0,8 c	8,4 c	3 b	1,3 b	0,5 c
CV	17,40	16,73	10,66	27,54	28,24	29,35	21,37	27,78

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).



Figura 2 Plântulas de *O. basilicum* nas variações do meio MS aos 40 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2013.

A concentração de sais do meio MS influenciou na qualidade e no teor dos constituintes da fração volátil das folhas de plântulas de *O. basilicum* (Tabela 5). A elevada concentração de sais do meio 2MS inibiu a síntese de mirceno, octanal, δ -3-careno, γ -terpineno, camphor, p-ment-1-en-8-ol, acetato de bornila e nerila, b-farneseno e b-bisaboleno. Sendo esse o meio o qual apresentou menor número de picos detectados. Já as demais concentrações de sais do meio MS foram detectados entre 21 a 23 constituintes.

Tabela 5 Constituição química da fração volátil de plântulas de *O. basilicum* no cultivo *in vitro* na variação dos sais do MS. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	2MS	MS	½MS	¼MS
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
a-pineno	933	0,32 ± 0,22	0,80 ± 0,07	0,64 ± 0,01	0,45 ± 0,00
sabineno	973	0,32 ± 0,26	0,79 ± 0,06	0,54 ± 0,03	0,44 ± 0,01
b-pineno	977	0,64 ± 0,48	1,51 ± 0,08	1,08 ± 0,06	0,93 ± 0,05
mirreno	991	nd	0,52 ± 0,09	0,46 ± 0,04	0,24 ± 0,00
octanal	1003	nd	0,14 ± 0,00	0,10 ± 0,01	nd
δ-3-careno	1011	nd	0,15 ± 0,01	nd	0,10 ± 0,01
limoneno	1029	0,24 ± 0,17	0,49 ± 0,04	0,48 ± 0,01	0,30 ± 0,00
1,8-cineol	1031	5,38 ± 4,31	12,29 ± 0,64	8,69 ± 1,03	7,05 ± 0,13
ocimeno	1047	0,98 ± 0,88	2,28 ± 0,33	1,73 ± 0,17	1,63 ± 0,02
γ-terpineno	1067	nd	0,31 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,16 ± 0,00
terpinoleno	1089	0,39 ± 0,23	0,46 ± 0,01	0,60 ± 0,13	0,27 ± 0,01
linalol	1104	0,58 ± 0,42	1,89 ± 0,96	4,47 ± 1,19	0,18 ± 0,05
camphor	1142	nd	0,56 ± 0,01	0,40 ± 0,03	0,39 ± 0,01
p-ment-1-en-8-ol	1168	nd	0,12 ± 0,00	0,09 ± 0,02	nd
a-terpineol	1192	0,36 ± 0,25	0,52 ± 0,02	0,48 ± 0,07	0,34 ± 0,02
estragol	1203	73,46 ± 19,15	71,52 ± 2,53	74,51 ± 2,28	66,10 ± 3,85
acetato de bornila	1287	nd	nd	nd	0,17 ± 0,02
acetato de nerila	1386	nd	0,11 ± 0,01	nd	0,33 ± 0,01
metileugenol	1408	12,47 ± 9,83	2,32 ± 0,01	1,15 ± 0,01	13,29 ± 2,73
b-cariofileno	1424	0,71 ± 0,04	0,40 ± 0,03	0,81 ± 0,08	1,42 ± 0,20
a-bergamoteno	1441	2,50 ± 0,68	1,80 ± 0,06	1,77 ± 0,05	3,39 ± 0,51
a-humuleno	1460	0,21 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,74 ± 0,11
b-farneseno	1462	nd	0,29 ± 0,02	0,12 ± 0,00	0,54 ± 0,07
germacreno D	1486	0,24 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,17 ± 0,03
b-bisaboleno	1489	nd	nd	nd	0,27 ± 0,08
Total identificado (%)		98,80	99,57	98,90	98,90
Número de compostos		15	23	21	23

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.
nd = não detectado.

Nas diferentes concentrações de sais do meio MS, o estragol teve o maior teor com pequena variação entre os meios de 66,10% a 74,51%. Em todos os meios ocorreu à presença do linalol (0,18% - 4,47%), mas em baixas quantidades. Maiores teores de 1,8-cineol foram obtidos no meio MS, porém

teores próximos foram detectados no ½MS e ¼MS. O dobro das concentrações dos sais diminuiu consideravelmente a produção desse constituinte (Tabela 6).

Tabela 6 Teores de três constituintes da fração volátil em plântulas *in vitro* de *O. basilicum* cultivadas em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	2MS	MS	½MS	¼MS
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
1,8-cineol	1031	5,38 ± 4,31	12,29 ± 0,64	8,69 ± 1,03	7,05 ± 0,13
linalol	1104	0,58 ± 0,42	1,89 ± 0,96	4,47 ± 1,19	0,18 ± 0,05
estragol	1203	73,46 ± 19,15	71,52 ± 2,53	74,51 ± 2,28	66,10 ± 3,85
Total identificado (%)		79,42	85,7	87,67	73,33

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos (MORAIS, 2009). Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos especiais em plantas ocorrem em diferentes níveis e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (HARTMANN, 1996). Segundo Kutchan (2001), os metabólitos especiais representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais.

3.3 Orientação de inoculação do segmento nodal

A fonte de explante é de grande importância para o bom desenvolvimento das culturas *in vitro*, teoricamente, a cultura de tecidos pode ser iniciada a partir de diferentes tipos de explantes, entretanto a regeneração *in vitro* é mais facilmente induzida em alguns órgãos e/ou tecidos (REY et al.,

2009) e determinar a posição correta de inoculação se torna de grande importância para a boa condução da cultura.

A orientação de inoculação de segmentos nodais de *O. basilicum* influenciou nas variáveis de número de folhas, biomassa seca de brotação, bem como para número e biomassa seca de raiz (Tabela 7), sendo a orientação de inoculação horizontal a que apresentou as melhores respostas, as demais variáveis não diferenciaram entre si.

Tabela 7 Média do número de folhas (NF), nós (NN); número (NB), altura (AB), biomassa seca das brotações (BSB); número (NR), comprimento (CR) e biomassa seca de raiz (BSR) de *O. basilicum* inoculado na vertical e horizontal. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Orientação	NF	NN	NB	AB (cm)	BSB (mg)	NR	CR (cm)	BSR (mg)
Vertical	17 b	4 a	2 a	8,5 a	33,15 b	5 b	3,05 a	5,36 b
Horizontal	20 a	4 a	2 a	9,9 a	47,42 a	6 a	3,06 a	7,53 a
CV	12,75	12,20	10,00	15,00	14,31	12,86	25,07	24,52

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

No cultivo *in vitro* de mirtilo, Erig e Schuch (2006) observaram que os explantes cultivados horizontalmente no meio de cultura tiveram melhor desenvolvimento. Os mesmos autores também afirmaram que melhor resultado obtido com os explantes cultivados na horizontal, possivelmente, se deve ao maior contato do explante com o meio de cultura, não apenas através da base cortada, mas de toda sua superfície, favorecendo a absorção de água, de nutrientes, além da quebra da dominância apical. Com uma maior área de contato para absorção de nutrientes e conseqüentemente melhorando a nutrição do explante, o segmento inoculado na horizontal formou plântulas mais vigorosas (Figura 3).



Figura 3 Plântulas de *O. basilicum* no cultivo *in vitro* inoculadas na orientação vertical (A) e horizontal (B). UFLA, Lavras, MG, 2013.

Embora a posição de inoculação horizontal tenha indicado as melhores respostas de crescimento, não foram observadas diferenças qualitativas e quantitativas da fração volátil. Um total de 34 constituintes químicos representa mais de 98% da composição química da fração volátil (Tabela 8).

Tabela 8 Constituição química da fração volátil de plântulas de *O. basilicum* com o segmento nodal inoculado na orientação vertical e horizontal. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	Seg. Nodal Vertical	Seg. Nodal Horizontal
		Área%±DP	Área%±DP
a-pineno	933	0,75±0,02	0,54±0,04
camphene	948	0,10±0,01	0,07±0,00
sabineno	973	0,80±0,00	0,51±0,11
b-pineno	977	1,46±0,00	0,99±0,20
6-metil-5-hepten-2-ona	986	0,18±0,14	0,19±0,14
mirreno	991	0,63±0,02	0,45±0,10
octanal	1003	0,26±0,03	0,29±0,04
limoneno	1028	0,58±0,00	nd
1,8-cineol	1031	10,76±0,05	7,57±1,94
ocimeno	1047	1,57±0,31	1,41±0,25
γ-terpineno	1067	0,26±0,01	0,19±0,05
terpinoleno	1089	0,61±0,03	0,57±0,11
linalol	1101	19,92±10,81	17,98±13,38
cânfora	1145	0,37±0,06	0,27±0,05
borneol	1167	0,09±0,00	0,07±0,02
a-terpineol	1192	0,50±0,02	0,39±0,07
estragol	1201	51,90±11,57	60,45±18,51
acetato de fenchila	1221	0,15±0,00	0,17±0,10
neral	1242	0,68±0,65	0,55±0,42
geranial	1271	0,77±0,74	0,60±0,45
acetato de bornila	1287	0,07±0,00	0,07±0,02
geranato de metila	1325	0,25±0,20	0,24±0,04
eugenol	1358	0,12±0,05	0,05±0,01
acetato de nerila	1384	nd	0,06±0,02
b-cubebeno	1393	0,09±0,03	0,08±0,03
metileugenol	1408	1,81±1,00	1,25±0,44
b-cariofileno	1424	1,10±0,08	0,93±0,03
a-bergamoteno	1441	2,02±0,04	1,79±0,43
a-humuleno	1459	0,43±0,01	0,35±0,06
b-farneseno	1462	0,08±0,03	0,09±0,07
germacreno D	1485	0,34±0,13	0,33±0,17
b-bisaboleno	1488	0,10±0,00	0,09±0,02
a-bulneseno	1509	0,10±0,03	0,09±0,02
t-cadinol	1548	0,22±0,02	0,19±0,02
Total identificado (%)		99,05	98,88
Número de compostos		33	33

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

DP: desvio padrão ($n = 2$); nd = não detectado; tr = traço ($\leq 0,01\%$).

3.4 Efeito dos reguladores de crescimento

Uma boa formação de folhas é fundamental para o bom crescimento da plântula *in vitro* e no caso do *O. basilicum* é importante também para a síntese do óleo essencial o qual ocorre nesse órgão da planta. Referente a isto, os resultados demonstraram que a ausência de regulador de crescimento teve menor produção de folhas, não diferenciando dos tratamentos que utilizaram ANA + BAP, ANA + TDZ e TDZ (Tabela 9). Os demais tratamentos foram benéficos para aumentar a formação de folhas na plântula não diferenciando entre si. Para a variável número de nós, as auxinas isoladas e as combinações de AIA e AIB com TDZ não diferenciou do controle.

Tabela 9 Média do número de folhas (NF), nós (NN); número (NB), altura (AB) e biomassa seca de brotações (BSB), % calogênese (%C), biomassa seca de calos (BSC); número (NR), comprimento (CR) e biomassa seca de raiz (BSR) de *O. basilicum* aos 40 dias de cultivo *in vitro* em diferentes reguladores de crescimento. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Trat. 0,5 + 2,0 (mg/L)	NF	NN	NB	AB (cm)	BSB (mg)	%C	BSC (mg)	NR	CR (cm)	BSR (mg)
AIA+BAP	17 a	2 b	2 b	1,9 d	25,3 b	82,0 b	31,7 d	0 d	0,0 e	0,0 d
AIB+BAP	15 a	2 b	2 b	1,6 d	20,7 b	97,3 a	22,0 d	2 c	2,0 d	1,9 c
ANA+BAP	12 b	1 b	3 a	1,5 d	17,8 b	100 a	83,3 b	0 d	0,0 e	0,0 d
AIA+TDZ	16 a	3 a	2 b	5,1 b	28,7 a	100 a	75,1 b	4 b	6,1 b	3,6 a
AIB+TDZ	17 a	3 a	2 b	4,5 b	27,8 a	97,3 a	56,9 c	2 c	2,3 d	1,9 c
ANA+TDZ	12 b	2 b	2 b	3,2 c	20,6 b	97,3 a	95,5 a	1 c	2,2 d	2,7 b
TDZ	13 b	2 b	2 b	2,9 c	25,0 b	87,3 b	18,7 d	1 c	0,6 e	1,7 c
BAP	16 a	2 b	3 a	1,6 d	31,3 a	84,7 b	11,6 e	1 c	1,9 d	1,6 c
AIA	18 a	4 a	2 b	7,3 a	36,0 a	11,7 d	2,0 f	6 a	8,7 b	1,4 c
AIB	18 a	3 a	2 b	6,6 a	33,6 a	64,3 c	1,5 f	6 a	9,7 b	1,9 c
ANA	16 a	3 a	2 b	6,8 a	42,7 a	69,3 c	20,7 d	5 b	13,7 a	1,8 c
Controle	14 b	3 a	2 b	4,6 b	17,2 b	0,0 d	0,00 f	6 a	1,8 c	4,3 c
CV	11,3	11,6	6,10	15,9	22,4	9,53	26,02	25,1	21,1	16,1

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O balanceamento dos reguladores de crescimento teve efeito no crescimento das plântulas. Na Tabela 9 pode-se observar que maiores números de brotações foram observados na presença do BAP e na combinação ANA + BAP, mostrando que esta citocinina apresentou efeito positivo para a formação de brotações. Estes resultados corroboram com Dode et al. (2003) que demonstraram que o BAP induziu aumento no número de explantes com brotos e no número de brotos/cotilédone. Para Rout et al. (2000), a adição de auxinas e citocininas exógenas têm um importante papel na indução e crescimento de brotações.

As auxinas isoladas foram responsáveis pelo incremento da altura das plântulas cultivadas *in vitro*, não diferenciando entre si, bem como para a biomassa seca de brotação que para esta variável também não diferenciou das combinações AIA e AIB com TDZ e o BAP isolado, provavelmente devido ao maior número de brotações que ocorre na presença das citocininas.

A utilização dos reguladores de crescimento induziu a formação de calos na base do explante, apenas no controle não ocorreu a calogênese. Maiores valores foram observados na presença da combinação de auxinas com citocininas, sendo a combinação ANA + TDZ responsável pelo maior incremento de biomassa seca de calos.

Não houve formação de raízes nas combinações de BAP com AIA e com ANA (Tabela 9 e Figura 4), maiores números de raízes foram observados no controle e na utilização de AIA e AIB isolados, porém a utilização de ANA apresentou efeito positivo para o crescimento das raízes. Já para biomassa seca de raízes, o AIA + TDZ acumulou maiores valores, resultados que discordam de Dode et al. (2003) que trabalhando com a mesma espécie não observaram formação de raízes na presença de ANA, mesmo quando combinadas com diferentes concentrações de citocinina. Estes resultados corroboram com Rosado et al. (2009) que não observaram formação de raízes no cultivo *in vitro* de

manjeriço, o único tratamento que apresentou indução de formação de raízes foi o tratamento sem o acréscimo de regulador de crescimento.

Aidam et al. (2008) demonstraram a capacidade morfogênica de *O. gratissimum* a partir de segmentos nodais cultivados em diferentes concentrações de auxinas e citocininas, os autores concluíram que ANA ou AIB diminuíram a calogênese e o crescimento de raízes, já o BAP ou cinetina induziram a emissão de brotos.

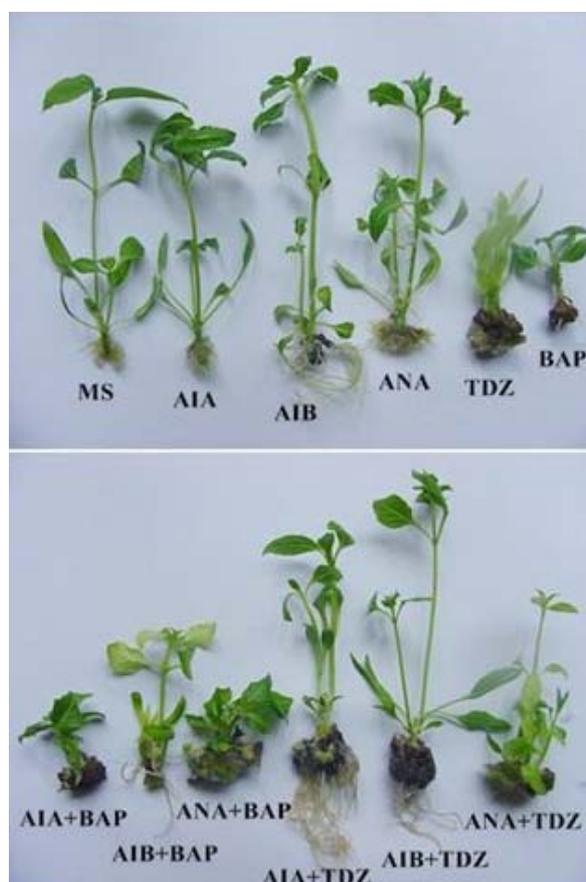


Figura 4 Plântulas de *O. basilicum* cultivadas *in vitro* suplementado com diferentes reguladores de crescimento aos 40 dias. UFLA, Lavras, MG, 2013.

A produção quantitativa e qualitativa da fração volátil pode alterar com a ontogenia, taxa fotossintética, fotoperíodo, qualidade de luz, mudanças de estação, nutrição, salinidade, temperatura, estrutura de armazenamento, reguladores de crescimento e cultivo *in vitro* (PRINS et al., 2010; SANGWAN et al., 2001).

A concentração e o tipo de regulador de crescimento suplementado ao meio de cultura são fatores que podem resultar em respostas diferentes. O manjeriço contém nos óleos essenciais fenilpropanóides e terpenóides. Na análise da fração volátil foram identificados 37 compostos, contendo mais de 98% da composição química nas plântulas (Tabela 10).

Tabela 10 Constituição química da fração volátil de plântulas de *O. basilicum* no cultivo *in vitro* em diferentes reguladores de crescimento. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	MS	AIA+BAP	AIB+BAP	ANA+BAP
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
a-pineno	933	0,59±0,01	0,32±0,06	0,22±0,05	0,31±0,02
canfeno	948	nd	nd	nd	nd
sabineno	973	0,54±0,04	0,35±0,03	0,17±0,03	0,27±0,01
b-pineno	977	1,12±0,04	0,73±0,05	0,38±0,07	0,58±0,02
6-metil-5-hepten-2-ona	985	0,65±0,42	nd	nd	nd
mirreno	990	0,48±0,08	0,22±0,06	0,14±0,05	0,18±0,01
octanal	1003	tr	0,15±0,00	tr	0,13±0,06
limoneno	1028	0,44±0,03	0,30±0,07	0,20±0,06	0,26±0,02
1,8-cineol	1031	9,48±0,51	6,68±0,47	3,28±0,61	5,02±0,21
ocimeno	1046	0,96±0,10	1,19±0,23	0,96±0,01	1,11±0,09
γ-τερπινενο	1067	0,24±0,00	0,16±0,02	tr	0,13±0,00
terpinoleno	1089	0,62±0,06	0,38±0,19	0,37±0,09	0,48±0,03
linalol	1103	29,62±12,48	4,68±0,03	0,61±0,44	2,36±0,27
cânfora	1145	0,37±0,03	0,70±0,00	0,43±0,00	0,54±0,00
borneol	1165	nd	nd	nd	nd
p-ment-1-en-8-ol	1168	nd	nd	nd	nd
a-terpineol	1192	0,49±0,02	0,47±0,04	0,26±0,10	0,30±0,04
estragol	1201	45,69±14,10	67,99±2,91	80,09±1,48	74,32±6,03
acetato de fenchila	1221	0,19±0,02	tr	tr	nd
neral	1242	0,49±0,13	tr	nd	tr
geraniol	1255	nd	nd	nd	nd
geranial	1271	0,53±0,14	tr	nd	tr
acetato de bornila	1287	nd	nd	nd	nd
geranato de metila	1325	0,31±0,05	nd	nd	tr
eugenol	1359	nd	tr	tr	0,18±0,00
a-copaeno	1378	nd	nd	nd	nd
acetato de nerila	1386	nd	0,38±0,13	0,33±0,04	0,36±0,10
b-cubebeno	1394	nd	nd	nd	nd
metileugenol	1406	0,59±0,49	8,62±4,35	7,76±3,89	8,55±4,18
b-cariofileno	1424	1,49±0,14	1,55±0,12	1,13±0,24	1,15±0,20
a-bergamoteno	1441	2,61±0,08	3,27±0,58	2,38±0,36	2,42±0,18
a-guaieno	1444	0,09±0,03	nd	nd	nd
a-humuleno	1459	0,41±0,05	0,47±0,05	0,38±0,11	0,39±0,06
b-farneseno	1462	0,08±0,04	0,23±0,05	0,10±0,02	0,10±0,02
germacreno D	1485	0,52±0,16	0,24±0,04	0,17±0,05	0,16±0,00
b-bisaboleno	1484	0,12±0,01	0,16±0,02	0,11±0,02	0,11±0,01
a-bulneseno	1509	0,15±0,04	nd	nd	nd
Total identificado (%)		98,87	99,24	99,47	99,41

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

DP: desvio padrão (n = 2); nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%).

Tabela 10, continuação

COMPOSTOS	IR ^a	AIA+TDZ	AIB+TDZ	ANA+TDZ	TDZ
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
a-pineno	933	0,62±0,02	0,57±0,06	0,50±0,05	0,57±0,16
canfeno	948	0,09±0,01	nd	nd	nd
sabineno	973	0,56±0,05	0,51±0,05	0,45±0,02	0,52±0,13
b-pineno	977	1,12±0,09	1,02±0,10	0,95±0,03	1,06±0,26
6-metil-5-hepten-2-ona	985	0,37±0,10	0,32±0,01	0,30±0,05	0,35±0,12
mirceno	990	0,46±0,01	0,42±0,04	0,39±0,01	0,42±0,12
octanal	1003	nd	0,15±0,01	tr	0,10±0,05
limoneno	1028	0,52±0,02	0,48±0,04	0,45±0,03	0,49±0,11
1,8-cineol	1031	10,16±1,05	9,31±0,89	8,90±0,24	9,51±1,90
ocimeno	1046	1,52±0,54	1,27±0,06	1,04±0,10	1,29±0,12
γ-τερπινενο	1067	0,27±0,04	0,24±0,03	0,23±0,00	0,25±0,04
terpinoleno	1089	1,04±0,02	0,98±0,17	0,96±0,13	0,91±0,21
linalol	1103	19,95±5,45	18,58±0,10	26,13±1,59	21,05±3,97
cânfora	1145	0,55±0,14	0,49±0,03	0,53±0,02	0,55±0,11
borneol	1165	nd	nd	nd	nd
p-ment-1-en-8-ol	1168	0,09±0,02	nd	tr	0,11±0,01
a-terpineol	1192	0,56±0,09	0,54±0,06	0,56±0,04	0,66±0,05
estragnol	1201	51,01±1,48	58,00±1,42	47,71±3,22	46,59±4,35
acetato de fenchila	1221	0,12±0,00	tr	0,14±0,04	0,18±0,04
neral	1242	0,41±0,07	0,36±0,03	0,75±0,06	0,77±0,61
geraniol	1255	nd	nd	nd	nd
geranial	1271	0,45±0,08	0,39±0,04	0,83±0,07	0,86±0,69
acetato de bornila	1287	nd	nd	nd	tr
geranato de metila	1325	0,44±0,10	0,32±0,06	0,42±0,02	0,37±0,01
eugenol	1359	nd	nd	nd	tr
a-copaeno	1378	nd	nd	nd	nd
acetato de nerila	1386	tr	tr	0,13±0,03	0,21±0,18
b-cubebeno	1394	nd	nd	nd	nd
metileugenol	1406	4,40±4,59	1,48±0,53	2,48±1,06	5,40±0,95
b-cariofileno	1424	0,89±0,10	0,83±0,15	1,10±0,27	1,57±0,81
a-bergamoteno	1441	2,56±0,44	2,06±0,02	2,69±0,39	3,29±1,47
a-guaieno	1444	nd	nd	nd	nd
a-humuleno	1459	0,33±0,04	0,30±0,04	0,41±0,07	0,64±0,41
b-farneseno	1462	0,13±0,08	0,10±0,02	tr	0,16±0,14
germacreno D	1485	0,47±0,07	0,42±0,01	0,52±0,03	0,52±0,05
b-bisaboleno	1484	0,12±0,02	0,10±0,00	0,13±0,02	0,17±0,08
a-bulneseno	1509	tr	nd	0,13±0,03	0,13±0,06
Total identificado (%)		98,81	99,24	98,83	98,7

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

DP: desvio padrão (n = 2); nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%).

Tabela 10, conclusão

COMPOSTOS	IR ^a	BAP	AIA	AIB	ANA
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
a-pineno	933	0,42±0,06	0,51±0,02	0,52±0,01	0,45±0,03
canfeno	948	nd	nd	nd	nd
sabineno	973	0,38±0,05	0,49±0,04	0,52±0,07	0,45±0,03
b-pineno	977	0,78±0,09	1,00±0,08	1,06±0,14	0,92±0,06
6-metil-5-hepten-2-ona	985	0,17±0,01	0,50±0,06	0,54±0,01	0,48±0,09
mirceno	990	0,30±0,04	0,51±0,01	0,46±0,03	0,44±0,04
octanal	1003	0,19±0,04	0,06±0,01	0,06±0,00	0,10±0,03
limoneno	1028	0,40±0,05	0,39±0,00	0,41±0,01	0,34±0,01
1,8-cineol	1031	7,06±0,37	8,93±0,83	9,19±1,54	8,33±0,19
ocimeno	1046	1,43±0,06	0,65±0,04	0,73±0,07	0,60±0,03
γ-τερπινενο	1067	0,20±0,00	0,23±0,03	0,21±0,00	0,20±0,03
terpinoleno	1089	0,84±0,03	0,51±0,07	0,54±0,04	0,40±0,02
linalol	1103	10,30±1,14	36,18±4,47	36,96±2,69	40,74±0,03
cânfora	1145	0,66±0,03	0,36±0,05	0,37±0,06	0,34±0,00
borneol	1165	nd	nd	0,07±0,00	0,10±0,03
p-ment-1-en-8-ol	1168	0,10±0,01	nd	0,09±0,01	0,09±0,00
a-terpineol	1192	0,55±0,06	0,52±0,07	0,52±0,04	0,52±0,01
estragol	1201	52,16±8,14	38,69±1,61	36,31±6,09	34,45±0,99
acetato de fenchila	1221	0,14±0,03	0,19±0,01	0,19±0,02	0,14±0,03
neral	1242	0,74±0,04	0,86±0,28	0,85±0,08	1,29±0,37
geraniol	1255	nd	nd	tr	tr
geranial	1271	0,84±0,05	0,94±0,31	0,94±0,08	1,42±0,41
acetato de bornila	1287	nd	0,08±0,01	0,09±0,01	0,07±0,00
geranato de metila	1325	0,32±0,02	0,54±0,07	0,49±0,06	0,56±0,08
eugenol	1359	0,31±0,05	nd	nd	tr
a-copaeno	1378	nd	0,11±0,02	tr	0,11±0,01
acetato de nerila	1386	0,32±0,07	nd	nd	tr
b-cubebeno	1394	nd	0,13±0,01	0,14±0,02	0,14±0,02
metileugenol	1406	13,67±7,14	1,02±1,04	1,78±1,75	0,70±0,31
b-cariofileno	1424	2,15±0,19	1,47±0,31	1,61±0,13	1,27±0,11
a-bergamoteno	1441	3,32±0,50	2,70±0,55	2,59±0,12	2,61±0,01
a-guaieno	1444	nd	0,11±0,01	0,13±0,02	0,12±0,02
a-humuleno	1459	0,77±0,11	0,32±0,11	0,41±0,03	0,33±0,03
b-farneseno	1462	tr	nd	0,08±0,03	nd
germacreno D	1485	0,37±0,03	0,73±0,13	0,67±0,05	0,78±0,11
b-bisaboleno	1484	0,17±0,03	0,13±0,03	0,13±0,00	0,13±0,01
a-bulneseno	1509	tr	0,20±0,02	0,22±0,03	0,21±0,04
Total identificado (%)		99,06	99,06	98,88	98,83

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcacos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

DP: desvio padrão (n = 2); nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%).

Analisando apenas os compostos 1,8-cineol, linalol e estragol e metileugenol, estes foram bastante influenciados pelo tipo de regulador suplementado ao meio de cultura (Tabela 11). As espécies do gênero *Ocimum* mais conhecidas apresentam como constituintes majoritários em seu óleo essencial o estragol, eugenol, linalol, 1,8-cineol, isso mostra que o cultivo *in vitro* possibilitou a biossíntese dos majoritários (BARITAUX et al., 1992).

Tabela 11 Fração volátil dos constituintes de plântulas de *O. basilicum* suplementado com diferentes reguladores de crescimento. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Tratamentos	1,8-Cineol	Linalol	Estragol	Metileugenol	Total (%)
MS	9,48±0,51	29,62±12,48	45,69±14,10	0,59±0,49	85,38
AIA+BAP	6,68±0,47	4,68±0,03	67,99±2,91	8,62±4,35	87,97
AIB+BAP	3,28±0,61	0,61±0,44	80,09±1,48	7,76±3,89	91,74
ANA+BAP	5,02±0,21	2,36±0,27	74,32±6,03	8,55±4,18	90,25
AIA+TDZ	10,16±1,05	19,95±5,45	51,01±1,48	4,40±4,59	85,52
AIB+TDZ	9,31±0,89	18,58±0,10	58,00±1,42	1,48±0,53	87,37
ANA+TDZ	8,90±0,24	26,13±1,59	47,71±3,22	2,48±1,06	85,22
TDZ	9,51±1,90	21,05±3,97	46,59±4,35	5,40±0,95	82,55
BAP	7,06±0,37	10,30±1,14	52,16±8,14	13,67±7,14	83,19
AIA	8,93±0,83	36,18±4,47	38,69±1,61	1,02±1,04	84,82
AIB	9,19±1,54	36,96±2,69	36,31±6,09	1,78±1,75	84,24
ANA	8,33±0,19	40,74±0,03	34,45±0,99	0,70±0,31	84,22

Neste trabalho, para *O. basilicum*, o meio suplementado com auxina e BAP aumentou o composto estragol em média 62% e auxina e TDZ apenas 14%. O metileugenol teve um grande aumento tanto com a suplementação de auxina com BAP e TDZ. O aumento desses dois compostos, da rota metabólica de fenilpropanoides, com a suplementação dos reguladores de crescimento no meio de cultura pode ser devido o aumento da atividade da enzima fenilalanina amônio liase (PAL) (KIM et al., 2006).

É interessante notar que os dois compostos da rota dos terpenoides foram negativamente afetados. A biossíntese de linalol foi inibida nos meios suplementados com auxinas e BAP. Houve uma redução de 91% e auxina e TDZ

em 27%. No entanto, quando o meio foi suplementado apenas com auxinas houve um aumento do linalol e diminuição de estragol.

Em comparação apenas com os dois compostos linalol e estragol; o estudo de *O. basilicum in vitro* revela que a classe de reguladores de crescimento isolado ou em combinação aparentemente influencia a rota dos fenilpropanoides e terpenoides. Quando as auxinas em combinação com as citocininas ou apenas as citocininas isoladas há uma tendência para a síntese de estragol e quando as auxinas estão isoladas a tendência é para a síntese de linalol.

Como os reguladores de crescimento controlam varias respostas morfogênicas, podem influenciar as respostas metabólicas, tais como quantidade e composição do óleo essencial tanto *in vivo* como *in vitro*, devido ao estímulo ou inibição de certas enzimas para os diferentes passos para a síntese dos óleos essenciais e metabolitos secundários (SUDRIÁ et al., 2001; SILVA, et al., 2005; AFFONSO et al., 2007; VICTORIA et al., 2011; COSTE et al., 2011; SHARAFZADEH; ZARE, 2011; GONÇALVES; ROMANO, 2013).

3.5 Estádio de desenvolvimento do explante

Durante o cultivo *in vitro*, a importância de se estabelecer a curva de crescimento de determinada espécie está na identificação das fases em que ocorrem processos fundamentais ao estudo cinético do seu crescimento. A partir desse estudo, pode-se estabelecer o momento exato de repicagem (SOARES, 2003).

Plântulas com 100 dias de cultivo *in vitro* manifestaram sintomas de deficiência nutricional caracterizadas por folhas amareladas e senescentes e presença de raízes adventícias ao longo do caule. Esses sintomas iniciaram por volta de 50 dias após a inoculação e agravaram-se ao longo dos dias (Figura 5).

Este dado indica que plântulas de *O. basilicum* devem permanecer por até 2 meses em um mesmo meio de cultura.



Figura 5 Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *O. basilicum* pelo período de 100 dias. Tempo 1 = 10 dias, Tempo 2 = 20 dias, Tempo 3 = 30 dias, Tempo 4 = 40 dias, Tempo 5 = 50 dias, Tempo 6 = 60 dias, Tempo 7 = 70 dias, Tempo 8 = 80 dias, Tempo 9 = 90 dias, Tempo 10 = 100 dias.

Com relação às variáveis da parte aérea, observou-se que o número de folhas foi aumentando conforme o passar dos dias, bem como altura das plântulas e por sua vez a biomassa seca de brotação (Tabela 12), porém as culturas devem ser transferidas para um novo meio de cultura, devido à redução de nutrientes, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas (SMITH, 1992).

Na primeira avaliação, aos 10 dias após a inoculação, não havia sinais de formação de raízes, que começaram a ser avaliadas a partir do vigésimo dia. Assim como a parte aérea, maiores valores relacionados ao sistema radicular foram aumentando com o passar dos dias (Tabela 12).

Tabela 12 Média do número de folhas (NF), altura (AB) e biomassa seca de brotações (BSB); número (NR), comprimento (CR) e biomassa seca de raiz (BSR) de *O. basilicum* ao longo de 100 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Dias	NF	AB (cm)	BSB (mg)	NR	CR (cm)	BSR (mg)
10	5	0,45	1,83	0	0,00	0,00
20	7	1,16	16,98	1	0,75	0,41
30	11	2,26	15,38	2	1,20	1,35
40	14	2,74	20,61	3	1,18	1,92
50	20	6,24	33,09	7	1,90	7,50
60	26	6,04	35,56	8	2,40	20,58
70	27	6,65	55,35	8	2,35	19,03
80	43	7,93	74,83	8	2,37	35,01
90	38	10,42	70,18	10	2,86	49,78
100	41	9,90	80,00	14	3,44	57,80

Foram identificados 37 compostos constituintes voláteis apresentados na ordem de eluição na Tabela 13, totalizando 97% da composição química relativa da fração volátil. Em média os compostos 1,8-cineol, linalol, estragol e metileugenol foram os constituintes de maiores teores no decorrer de 100 dias.

Teores consideráveis de b-cariofileno e a-bergamoteno também foram detectados, mostrando que esses constituintes estão presentes na composição química da fração volátil durante o crescimento da plântula, já a presença de geraniol foi apenas detectada no período de 40 a 80 dias.

Das diferenças quantitativas, no decorrer dos dias, os teores de 1,8-cineol mantiveram-se equilibrados com valores de mínimo de $6,68 \pm 2,33\%$ aos 90 dias e máximo de $12,79 \pm 1,94\%$ aos 20 dias (Tabela 13).

A variação do linalol foi marcante no decorrer dos dias, com mínimo de $10,59 \pm 6,60\%$ aos 90 dias e máximo de $29,89 \pm 3,09\%$ aos 60 dias, esses dados mostram que a permanência por mais de 60 dias no cultivo *in vitro* tende a causar diminuição nos teores desse constituinte (Tabela 13).

Tabela 13 Constituição química da fração volátil de plântulas de *O. basilicum* no cultivo *in vitro* no decorrer de 100 dias. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	0	10	20	30
		Área	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
a-pineno	933	0,41	0,61±0,05	0,66±0,07	0,60±0,07
camphene	948	0,07	0,10±0,02	0,11±0,01	0,11±0,02
sabineno	973	0,46	0,62±0,16	0,69±0,11	0,68±0,16
b-pineno	977	1,03	1,32±0,25	1,42±0,20	1,42±0,30
6-metil-5-hepten-2-ona	987	0,09	0,11±0,03	0,13±0,01	0,09±0,07
mirreno	991	0,27	0,41±0,10	0,46±0,05	0,43±0,08
octanal	1004	0,04	0,06±0,02	0,10±0,02	0,06±0,01
limoneno	1028	0,38	0,55±0,09	0,63±0,06	0,57±0,10
1,8-cineol	1031	8,38	11,61±2,02	12,79±1,94	12,60±2,57
ocimeno	1047	0,63	1,18±0,22	1,27±0,18	1,12±0,31
□-terpineno	1067	0,19	0,29±0,04	0,35±0,03	0,31±0,07
terpinoleno	1089	0,36	1,11±0,00	1,11±0,01	0,68±0,05
linalol	1102	24,19	16,03±0,50	19,19±0,37	22,24±1,48
camphor	1145	0,54	0,74±0,07	0,79±0,09	0,81±0,23
p-ment-1-en-8-ol	1167	0,09	0,15±0,02	0,17±0,03	0,16±0,04
a-terpineol	1191	0,49	0,82±0,06	0,86±0,06	0,85±0,14
estragol	1201	41,91	44,59±2,70	39,26±4,33	36,16±8,29
acetato de fenchila	1221	0,12	0,24±0,04	0,28±0,04	0,18±0,02
neral	1242	0,47	0,34±0,04	0,50±0,01	0,74±0,32
geraniol	1257	0,61	nd	nd	nd
geranial	1271	0,55	0,37±0,05	0,56±0,00	0,86±0,36
acetato de bornila	1287	0,11	0,16±0,03	0,19±0,01	0,18±0,01
geranato de metila	1325	1	0,22±0,01	0,18±0,05	0,15±0,11
eugenol	1358	0,14	tr	0,16±0,09	0,67±0,37
a-copaeno	1383	nd	0,19±0,03	0,34±0,01	0,30±0,05
acetato de nerila	1385	0,58	nd	nd	nd
b-cubebeno	1393	0,12	nd	nd	nd
metileugenol	1407	9,5	8,07±0,29	7,94±0,83	7,86±4,19
b-cariofileno	1423	1,38	2,49±0,19	2,49±0,18	2,17±0,40
a-bergamoteno	1441	3,01	4,35±0,17	4,18±0,30	4,55±1,13
a-guaieno	1444	0,11	nd	nd	0,06±0,01
a-humuleno	1459	0,33	1,16±0,15	1,14±0,13	0,84±0,12
b-farneseno	1462	0,12	0,35±0,10	0,32±0,03	0,32±0,18
germacreno D	1485	0,37	0,39±0,03	0,31±0,03	0,34±0,00
b-bisaboleno	1488	0,13	0,25±0,01	0,22±0,01	0,23±0,06
a-bulneseno	1508	0,17	0,05±0,00	0,05±0,01	0,10±0,01
t-cadinol	1547	0,1	0,38±0,09	0,43±0,05	0,33±0,02
Total identificado (%)		99,14	99,30	99,32	99,00

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

DP: desvio padrão ($n = 2$); nd = não detectado; tr = traço ($\leq 0,01\%$).

Tabela 13, continuação

COMPOSTOS	IR ^a	40	50	60	70
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
a-pineno	933	0,50±0,04	0,73±0,15	0,53±0,00	0,55±0,02
camphene	948	0,08±0,01	0,11±0,03	0,08±0,01	0,09±0,02
sabineno	973	0,51±0,14	0,64±0,14	0,57±0,08	0,62±0,03
b-pineno	977	1,12±0,27	1,41±0,33	1,26±0,18	1,36±0,07
6-metil-5-hepten-2-ona	987	0,13±0,02	0,26±0,17	0,16±0,10	0,12±0,04
mirceno	991	0,33±0,04	0,50±0,06	0,36±0,01	0,36±0,01
octanal	1004	0,06±0,00	0,07±0,01	0,07±0,04	0,06±0,01
limoneno	1028	0,47±0,04	0,55±0,05	0,46±0,00	0,48±0,04
1,8-cineol	1031	10,56±3,02	12,04±2,38	11,02±1,84	11,50±0,62
ocimeno	1047	0,82±0,02	1,01±0,18	0,80±0,13	1,05±0,39
□-terpineno	1067	0,23±0,09	0,23±0,02	0,22±0,07	0,23±0,00
terpinoleno	1089	0,73±0,10	0,69±0,03	0,47±0,12	0,41±0,07
linalol	1102	21,44±7,24	26,03±2,53	29,89±3,09	28,51±16,46
camphor	1145	0,65±0,09	0,54±0,10	0,57±0,15	0,70±0,31
p-ment-1-en-8-ol	1167	0,06±0,00	0,10±0,01	0,12±0,02	0,13±0,03
a-terpineol	1191	0,75±0,15	0,60±0,02	0,63±0,09	0,66±0,18
estragol	1201	43,33±15,12	44,37±1,98	34,56±12,95	25,27±6,51
acetato de fenchila	1221	0,21±0,05	0,21±0,01	0,17±0,07	0,15±0,03
neral	1242	0,70±0,00	0,62±0,11	0,46±0,43	0,39±0,01
geraniol	1257	tr	tr	0,52±0,44	tr
geranial	1271	0,79±0,00	0,69±0,13	0,51±0,47	0,45±0,02
acetato de bornila	1287	0,16±0,03	0,12±0,01	0,13±0,02	0,15±0,05
geranato de metila	1325	tr	0,21±0,04	0,44±0,02	0,33±0,20
eugenol	1358	0,25±0,09	0,10±0,05	0,44±0,48	1,15±0,24
a-copaeno	1383	0,21±0,06	tr	0,07±0,00	0,44±0,32
acetato de nerila	1385	nd	nd	0,20±0,13	nd
b-cubebeno	1393		nd	0,10±0,01	tr
metileugenol	1407	6,22±1,98	1,53±1,49	6,86±6	12,55±7,28
b-cariofileno	1423	2,11±0,24	1,53±0,18	1,69±0,06	2,20±0,75
a-bergamoteno	1441	4,13±1,06	2,86±0,18	4,11±1,04	5,52±2,12
a-guaieno	1444	nd	nd	0,10±0,00	0,11±0,05
a-humuleno	1459	0,81±0,07	0,50±0,05	0,52±0,00	0,70±0,32
b-farneseno	1462	0,24±0,08	0,07±0,01	0,16±0,08	0,23±0,14
germacreno D	1485	0,34±0,10	0,38±0,04	0,37±0,02	0,40±0,00
b-bisaboleno	1488	0,21±0,05	0,14±0,00	0,19±0,05	0,27±0,11
a-bulneseno	1508	0,07±0,01	0,12±0,00	0,14±0,03	0,16±0,13
t-cadinol	1547	0,33±0,04	0,32±0,05	0,20±0,09	0,16±0,03
Total identificado (%)		98,79	99,4	99,37	97,81

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcacos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

DP: desvio padrão (n = 2); nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%).

Tabela 13, conclusão

COMPOSTOS	IR ^a	80	90	100
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
a-pineno	933	0,50±0,02	0,43±0,06	0,46±0,01
camphene	948	0,08±0,01	0,07±0,01	0,08±0,01
sabineno	973	0,53±0,15	0,36±0,14	0,34±0,06
b-pineno	977	1,19±0,35	0,84±0,30	0,90±0,05
6-metil-5-hepten-2-ona	987	0,16±0,00	0,10±0,02	0,14±0,01
mirreno	991	0,35±0,01	0,26±0,05	0,24±0,00
octanal	1004	0,06±0,03	0,12±0,03	0,05±0,01
limoneno	1028	0,43±0,05	0,36±0,06	0,32±0,01
1,8-cineol	1031	10,15±3,54	6,68±2,33	7,12±0,26
ocimeno	1047	0,84±0,03	0,76±0,18	0,70±0,31
□-terpineno	1067	0,20±0,07	0,13±0,07	0,11±0,02
terpinoleno	1089	0,44±0,04	0,45±0,04	0,41±0,08
linalol	1102	22,61±7,39	10,59±6,60	17,72±4,35
camphor	1145	0,67±0,27	0,45±0,18	0,59±0,13
p-ment-1-en-8-ol	1167	0,12±0,06	nd	0,08±0,02
a-terpineol	1191	0,67±0,25	0,39±0,15	0,52±0,06
estragol	1201	38,33±24,15	67,39±18,54	46,42±9,95
acetato de fenchila	1221	0,15±0,06	0,18±0,01	0,26±0,04
neral	1242	0,78±0,11	0,45±0,24	0,97±0,24
geraniol	1257	tr	nd	nd
geranial	1271	0,86±0,11	0,49±0,26	1,09±0,31
acetato de bornila	1287	0,15±0,04	0,10±0,02	0,18±0,01
geranato de metila	1325	0,52±0,16	0,30±0,09	0,74±0,13
eugenol	1358	0,22±0,12	tr	0,18±0,14
a-copaeno	1383	0,11±0,09	nd	nd
acetato de nerila	1385	nd	nd	nd
b-cubebeno	1393	0,11±0,01	0,07±0,03	0,13±0,02
metileugenol	1407	9,21±7,05	3,39±4,68	9,53±11,88
b-cariofileno	1423	2,19±0,86	1,24±0,59	2,37±0,45
a-bergamoteno	1441	4,79±2,56	2,43±1,30	4,72±0,81
a-guaieno	1444	0,11±0,00	0,07±0,03	0,15±0,03
a-humuleno	1459	0,64±0,19	0,31±0,15	0,73±0,23
b-farneseno	1462	0,18±0,14	tr	0,12±0,05
germacreno D	1485	0,48±0,14	0,24±0,11	0,42±0,02
b-bisaboleno	1488	0,25±0,14	0,12±0,07	0,24±0,04
a-bulneseno	1508	0,13±0,00	0,11±0,07	0,25±0,02
t-cadinol	1547	0,24±0,07	0,18±0,02	0,31±0,07
Total identificado (%)		99,96	99,25	99,08

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

DP: desvio padrão (n = 2); nd = não detectado; tr = traço (≤ 0,01%).

Nas condições testadas, o estragol foi o constituinte de maior teor ao longo dos dias. Notou-se que quanto mais a plântula permanece *in vitro*, maiores teores de estragol são detectado, chegando a $67,39 \pm 18,54\%$ aos 90 dias, fato que discorda de Carvalho Filho et al. (2006) que verificaram que o linalol (68%) é o principal composto presente nas folhas e inflorescências de manjerição (Tabela 13).

3.6 Produção de constituintes voláteis na planta matriz, plântula *in vitro* e aclimatizada

Vários fatores físicos e químicos no desenvolvimento da planta podem afetar os constituintes do óleo essencial. As condições de cultivo da planta matriz, da plântula *in vitro* e aclimatizada de *O. basilicum* afetaram os teores e a composição volátil do óleo essencial (Tabela 14). Paul et al. (2010) demonstraram em *Pogostemon cablin* que os constituintes do óleo essencial de plantas *in vivo* e *in vitro* foram similares. Entretanto, o conteúdo dos constituintes foi diferente entre as plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro*.

Tabela 14 Constituição química da fração volátil de folhas da planta matriz, plântulas *in vitro* e aclimatizadas de *O. basilicum*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	Matriz	Aclimatizada	<i>In vitro</i>
		Área %±DP	Área %±DP	Área %±DP
α-pineno	933	0,50±0,05	0,44±0,01	0,61±0,04
camphene	948	0,10±0,01	nd	0,08±0,01
sabineno	973	0,83±0,06	0,31±0,01	0,53±0,04
b-pineno	977	1,61±0,12	0,91±0,01	1,07±0,07
6-metil-5-hepten-2-ona	986	nd	nd	0,51±0,03
mirceno	991	0,40±0,04	0,24±0,07	0,51±0,09
octanal	1003	nd	nd	0,07±0,00
limoneno	1029	0,59±0,05	0,25±0,02	0,53±0,03
1,8-cineol	1031	12,08±0,50	12,36±0,03	9,08±0,84
ocimeno	1047	0,62±0,07	nd	1,16±0,21
α-terpineno	1067	0,31±0,01	0,23±0,02	0,21±0,03
terpinoleno	1089	0,20±0,02	nd	0,79±0,05
linalol	1104	68,20±0,53	31,43±9,83	24,28±0,27
acetato de octen-1-ol	1113	0,12±0,01	nd	nd
camphor	1142	nd	0,87±0,11	0,35±0,05
borneol	1166	0,16±0,02	nd	nd
p-ment-1-en-8-ol	1168	0,15±0,01	nd	0,07±0,01
a-terpineol	1192	0,66±0,01	0,90±0,10	0,47±0,02
estragol	1203	nd	48,21±9,06	53,68±1,18
acetato de fenchila	1221	nd	nd	0,12±0,01
neral	1242	nd	nd	0,27±0,11
geranial	1271	nd	nd	0,29±0,13
geraniol	1255	5,77±0,52	nd	nd
acetato de bornila	1287	0,32±0,01	nd	0,06±0,01
geranato de metila	1325	nd	nd	0,34±0,08
a-copaeno	1378	0,10±0,00	nd	nd
acetato de nerila	1386	0,46±0,01	nd	nd
b-cubebeno	1392	0,10±0,01	nd	0,07±0,00
b-elemeno	1394	0,14±0,01	nd	nd
metileugenol	1408	nd	nd	0,31±0,12
b-cariofileno	1424	0,26±0,00	nd	1,04±0,09
a-bergamoteno	1441	2,76±0,02	3,41±0,42	1,91±0,02
a-guaieno	1444	0,11±0,00	nd	0,07±0,00
a-humuleno	1460	nd	nd	0,32±0,03
germacreno D	1486	0,40±0,02	nd	0,42±0,01
b-bisaboleno	1489	0,13±0,00	nd	0,09±0,00
a-bulneseno	1510	0,21±0,01	0,30±0,02	0,08±0,00
t-cadineno	1519	0,78±0,02	nd	0,26±0,02
t-cadinol	1649	0,47±0,04	nd	nd
Total identificado (%)		98,53	99,85	99,64
Número de compostos		29	13	32

Índice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

DP: desvio padrão (n = 2); nd = não detectado.

Analisando apenas os constituintes 1,8-cineol, linalol, estragol e metileugenol, observa-se que na planta matriz não foi detectado o composto estragol (Tabela 15). No entanto, na plântula *in vitro* e aclimatizada foi detectado um valor de 53,68 e 48,21%, respectivamente. Esta redução pode ser devido à idade das folhas nos diferentes ambientes.

Estragol e metileugenol são os produtos da metilação do chavicol e eugenol respectivamente. Esta conversão é feita pelas enzimas chavicol-0-metiltransferase (COMT) e eugenol-0-metiltransferase (MT), respectivamente. Cicero et al. (2006) demonstraram a redução da atividade dessas enzimas (COMT e MT) em folhas mais velhas do que folhas jovens. Camilo et al. (2006), Luz et al. (2009) e Blank et al. (2007) não detectaram a presença de estragol na composição química do manjeriço em plantas cultivadas no campo.

Em relação ao constituinte 1,8-cineol não houve grande diferença entre os ambientes. Entretanto, o linalol foi próximo daquele citado por Blank et al. (2007) com média de 78,12% para a cultivar Maria Bonita. No entanto, houve uma queda nas plantas aclimatizadas de 54% e cultivadas *in vitro* de 64% (Tabela 15).

Tabela 15 Constituição química de quatro constituintes em folhas da planta matriz, de plântulas *in vitro* e de plântulas aclimatizadas de *O. basilicum*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	Matriz	Aclimatizada	<i>In vitro</i>
		Área %±DP	Área %±DP	Área %±DP
1,8-cineol	1031	12,08±0,50	12,36±0,03	9,08±0,84
linalol	1104	68,20±0,53	31,43±9,83	24,28±0,27
estragol	1203	nd	48,21±9,06	53,68±1,18
metileugenol	1408	nd	nd	0,31±0,12
Total (%)		80,28	92,00	87,35

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS.

O óleo essencial de muitas espécies da família Lamiaceae é composto de mono e sesquiterpenos. O gênero *Ocimum* contém muitas espécies que o óleo

essencial é composto de monoterpenos, como linalol, citral, limoneno, geraniol e timol. Mas também tem outros membros do gênero, como o manjericão (*O. basilicum*), que contém na sua composição alta proporção de fenilpropanoides como eugenol e estragol (IIJIMA et al., 2004).

A espécie está se comportando *in vitro* na rota biossintética do fenilpropeno e *in vivo* na rota dos monoterpenos. Isto pode estar ocorrendo devido à planta esta num estágio de desenvolvimento jovem ter maior atividade de fenilalanina amônio liasa (PAL) do que no estágio maduro e também a atividade varia com os quimiotipos de *Ocimum* (IIJIMA et al., 2004).

Os resultados sugerem que a plântula *in vitro* está num estágio juvenil do que *in vivo*. Assim, a rota metabólica está direcionada para a produção de maior concentração de estragol. Lewinsohn et al. (2000) demonstraram folhas jovens em desenvolvimento é o site primário para a biossíntese de estragol.

4 CONCLUSÃO

Para o crescimento e produção de constituintes *in vitro* de *O. basilicum* cv. Maria Bonita o meio MS suplementado com ANA é o mais indicado, porém a plântula deve permanecer por até dois meses num mesmo meio de cultura, sendo o segmento nodal inoculado na orientação horizontal o que proporciona melhor crescimento dos explantes. O linalol apresenta baixos teores, sendo o estragol o constituinte mais abundante nas plântulas de *O. basilicum* cultivadas *in vitro*, porém o uso de auxinas elevam os teores de linalol e após a aclimatização, plântulas cultivadas *in vitro*, aumentam os teores de linalol.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. London: Allured Pub. Corp. 2007. 804 p.

AFFONSO, V. R.; BIZZO, H. R.; LIMA, S. S.; ESQUIBEL, M. A.; SATO, A. Solid phase microextraction (SPME) analysis of volatile compounds produced by *in vitro* shoots of *Lantana camara* L. under the influence of auxin and cytokinins. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1504-1508, 2007.

AIDAM, P. A., ETSE, K. D., KOKA, K., RAYNAUD, C., SANDA, K., CHAUMONT, J. P. *In vitro* morphogenetic capacities, in field performance and essential oils production in *Ocimum gratissimum* L. **Acta Botanica Gallica**, v. 155, n. 33, p. 341-354, 2008.

AKITA, T. et al. New medium composition for high betacyanin production by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 902-905, 2002.

ASSIS, K. C. de; PEREIRA, F. D.; CABRAL, J. S. R.; SILVA, F. G.; SILVA, J. W. ; SANTOS, S. C. dos. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 1, p. 77-83, 2012.

BARITAU, O.; RICHARD, T. J.; DERBESY, M. Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil basil, *Ocimum basilicum* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, p. 267-271, 1992.

BLANK, A. F.; SILVA, P. de A.; ARRIGONI-BLANK, M. de F., MANN, R. S.; BARRETO, M. C. de V. Influência da adubação orgânica e mineral no cultivo de manjeriço cv. Genovese. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 2, p. 175 -180, 2005.

BLANK, A. F.; SOUZA, V. M. de; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; PAULA, J. W. A. de; ALVES, P. B. Novas cultivares Maria Bonita cultivar de manjeriço tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 12, p. 811-1813, 2007.

CAMILO, J. da S.; LUZ, J. M. Q.; RESENDE, R. F. Produção agronômica de *Ocimum basilicum* L. em casa de vegetação e a campo nas épocas Primavera-Verão e Outono-Inverno. In: IX Encontro Interno & XIII Seminário de Iniciação Científica, 2009. Uberlândia. **Resumos...PIBIC-UFU, CNPq & FAPEMIG**, 2006.

CARVALHO FILHO, J. L. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; EHLERT, P. A. D.; MELO, A.S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 24-30, 2006.

CICERO, D.; GANG, D.; DUDAREVA, D.; SIMON, J. Developmental regulation of phenylpropene essential oil biosynthesis in leaves and glandular trichomes of basil (*Ocimum basilicum* L.). **International Journal of Plant Sciences**, v. 167, p.447- 454, 2006.

CHAGAS, E. A.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, E. F. da; PASQUAL, M.; MENDONÇA, V. Multiplicação *in vitro* de crisântemo cv. white polaris. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 123-126, 2004.

COSTE, A.; VLASE, L.; HALMAGYI, A.; DELIU, C.; COLDEA, G. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell Tissue and Organ culture**, v. 106, p. 279-288, 2011.

COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'Barrier' em diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) e do meio Murashige & Skoog (MS). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 4, p. 367-370, out-dez. 2003.

DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, v. 503, n. 1, p. 1-24, 1990.

DISARZ, R.; CORDER, M. P. M. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* de wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, v. 33, n. 4, p. 599-606, 2009.

DODE, L. B.; BOBROWSKI, V. L.; BRAGA, E. J. B.; SEIXAS, F. K.; SCHUCH, M. W. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 435-437, 2003.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Fatores que afetam a multiplicação *in vitro* de mirtilo. **Scientia Agraria**, v. 7, n. 1-2, p. 83-88, 2006.

EHLERT, P. A. D. Propagação vegetativa da alfavaca cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 10-3, 2004.

FAVORITO, P. A.; ECHER, M. M.; OFFEMANN, L. C.; SCHLINDWEIN, M. D.; COLOMBARE, L. F.; SCHNEIDER, R. P.; HACHMANN, T. L. Características produtivas do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função do espaçamento entre plantas e entre linhas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.1 3, especial, p. 582-586, 2011.

FERNANDES, P. C.; FACANALI, R.; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; MARQUES, M. O. M. Cultivo de manjeriço em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 260-264, 2004.

FERNANDEZ-GARCIA, N.; GARMA, J. G. de ; OLMOS, E. ROS as biomarkers of hyperhydricity. In: GUPTA, D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. London Local: Sciences Publishers, 2011. Cap.12, p. 249-272.

FERREIRA, D.F. **Sisvar** Versão 5.0. Departamento de Ciências Exatas. UFLA, Lavras, MG, 2007.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* D.C.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology advances**, v. 31, p. 166-174, 2013.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 177-188, 1996.

HUSAIN, M. K.; ANIS, M. Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). **Acta physiologiae plantarum**, v. 31, n. 4, p. 765-772, 2009.

IJIMA, Y ; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; FRIDMAN, E.; GANG, D. R.; BAR, E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3724–3736, 2004.

KIM, H. J.; CHEN, F.; CHEN, F.; RAJAPAKSE, N. C. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 54, p. 2327-2332, 2006.

KUMAR, S. et al. *In vitro* propagation of *Pluchea lanceolata*, a medicinal plant, and effect of heavy metals and different aminopurines on quercetin content. ***In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, v. 40, n. 2, p. 171-176, 2004.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigma of secondary metabolism. ***Plant Physiology***, v. 125, p. 58-60, 2001.

LEWINSOHN, E., ZIV-RAZ, I., DUDAI, N., TADMOR, Y., LASTOCHKIN, E., LARKOV, O., CHAIMOVITSH, D., RAVID, U., PUTIEVSKY, E., PICHERSKY, E., SHOHAM, Y. Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L). Developmental and chemotypic association of allylphenol *O*-methyltransferase activities. ***Plant Science***, v. 160, p. 27-35, 2000.

LOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. ***Proceedings-International Plant Propagators Society***, v. 30, p. 421-427, 1980.

LUZ, J. M. Q.; MORAIS, T. P. S.; BLANK, A. F.; SODRÉ, A. C. B.; OLIVEIRA, G. S. Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de manjeriço sob doses de cama de frango. ***Horticultura Brasileira***, v.27, p.349-353, 2009.

MORAIS; L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. ***Horticultura Brasileira***, v. 27, n. 2, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum***, v. 15, p. 473-97, 1962.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version of the NIST/EPA/NIH mass spectral database**: software. Gaithersburg, 2008.

NAVROSKI, M. C.; WALDOW, D. A. G.; PEREIRA, M. de O.; PEREIRA, A. de O. Calogênese *in vitro* de segmentos apicais caulinares e intermodais em segurelha (*Satureja hortensis* L.). **Revista Agroambiente**, v. 6, n. 3, p. 228-234, 2012.

OLIVEIRA, M. C.; SIMOES, K.; BRAGA, M. R. Substâncias antifúngicas constitutivas e induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 3, p. 509-519, 2009.

PAUL, A.; THAPA, G.; BASU, A.; MAZUMDAR, P.; KALITA, M.C.; SAHOO, L. Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.- Na industrially important aromatic plant. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 366-374, 2010.

PRINS, C. L.; VIEIRA, I. J. C.; FREITAS, S. P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 22, n.2, p. 91-102, 2010.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 331-335, 2009.

REY, M. dos S.; PINHO, D. S. de, VIEIRA, A. P.; BRAGA, E. J. B.; PIEROBOM, C. R.; PETERS, J. A. Regeneração *in vitro* de mesocótilos de arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 15, n. 1-4, p. 23-29, 2009.

RIBEIRO, M. de F.; DONINI, L.; P. SOUZA, J. A.; GUISSO, A. P.; FERREIRA-MOURA, I.; BOBROWSKI, V. L.; VIÉGAS, J. Influência de diferentes concentrações de sais de MS e açúcares no cultivo *in vitro* de manjerição roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 57-59, 2007.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 333-340, 2010.

ROSADO, L. D. S.; PINTO, J. E. B. P.; BOTREL, P. P.; BLANK, A. F., BERTOLUCCI, S. K. V. Aspectos do cultivo *in vitro* do manjeriço cv. Maria Bonita (*Ocimum basilicum* L.). **Plant Cell Cult. Micropropag.**, v. 5, n. 2, p. 71-78, 2009.

ROUT, G. R. et al. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 91-120, 2000.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulator**, v. 34, p. 3-21, 2001.

SHARAFZADEH, S. E.; ZARE, M. Influence of growth regulators on growth and secondary metabolites of some medicinal plants from Lamiaceae family. **Advances in Environmental Biology**, v. 5, n. 8, p. 2296-2302, 2011.

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 Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1387-1390, 2005.

SILVA, I. M.; GUSMÃO, S. A. L.; BARROS, A. C. A.; GOMES, R. F.; SILVA, J. P.; PEREIRA, J. K. B. Enraizamento de manjeriço em diferentes substratos e doses de cinzas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n. esp., p.188-191, 2012.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture**: techniques and experiments. San Diego: Academic, 1992. 171 p.

SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.]**. 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SORACE, M., FARIA, R.T. de, JUNIOR, C.V.D., GOMES, G.P., BARBOSA, C.M., VIEIRA, F.G.N., SILVA, G.L. da., TAKAHASHI, L.S.A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Ciências Agrárias**, v.29, n.4, p.775-782, 2008.

SUDRIÁ, C.; PALAZÓN, J.; CUSIDÓ, R.; BONFILL, M.; PIÑOL, M. T.; MORALES, C. Effect of benzyladenine and indolebutyric acid on ultrastructure, glands formation, and essential oil accumulation in *Lavandula dentate* plantlets. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 1, p. 1-6, 2001.

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

VELLOSO, M. A. L.; ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo *in vitro*. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 267-272, 2009.

VICTORIA, C. P.; RICARDO, M. K.; LAGE, C. L. S. Leaf and aroot volatiles produced by tissue culture of *Alpinia zerumbet* (PERS.) Burt & Smith under the influence of different plant growth regulatores. **Quimica Nova**, v. 34, n. 3, p. 430-433, 2011.

ZHANG, L. et al. Factors influencing shoot regeneration from cotyledons of tetraploid *Isatis indigotica* F. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 39, n. 05, p. 459-462, 2003.

CAPÍTULO 3
Crescimento e produção *in vitro* de compostos voláteis de *Mentha arvensis* L.
sob a influência de fatores químicos

RESUMO

Mentha arvensis é uma planta produtora de óleo essencial rico em mentol, composto de grande importância na indústria farmacêutica e alimentícia. Objetivou-se identificar as condições mais adequadas de cultivo *in vitro* que possibilitem melhor crescimento da planta e produção de constituintes voláteis nas folhas de *Mentha arvensis*. Para isso, foram realizados seis experimentos: diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM); diferentes concentrações do meio MS (2MS, MS, $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{4}$ MS); orientação de inoculação (vertical e horizontal) dos explantes, diferentes reguladores de crescimento (auxinas e citocininas), estágio de desenvolvimento do explante e comparação da fração volátil entre a planta matriz, aclimatizada e cultivada *in vitro*. O meio básico MS foi o que melhor proporcionou o crescimento de plântulas *in vitro* de *M. arvensis*, sendo o meio B5 a apresentar maior teor de mentol. Nas concentrações MS e 2MS elevou os teores de mentol, porém reduziu o crescimento da plântula, com isso, optou-se pelo uso do meio MS na formulação original. O segmento nodal inoculado na orientação horizontal por proporcionar melhor crescimento dos explantes e maiores níveis de mentol. Os diferentes reguladores de crescimento influenciaram no desenvolvimento e na composição química das plântulas, sendo o BAP e ANA responsáveis pelas maiores variações na composição química da fração volátil, principalmente nos teores de pulegona e mentol. Plântulas cultivadas *in vitro* de *M. arvensis* podem permanecer por até 100 dias num mesmo meio de cultura, sendo observado que quanto maior o tempo no cultivo *in vitro*, maior o acúmulo de mentol. Plântulas *in vitro* de *M. arvensis* tendem a acumular pulegona, mas após a aclimatização, a planta acumula mentol em teores próximos ao da planta matriz.

Palavras-chave: Micropropagação. Metabólitos especiais. Hortelã japonesa. Mentol.

ABSTRACT

Mentha arvensis is a plant produces an essential oil rich in menthol, composed of great importance in the pharmaceutical and food industries. The aim of this research was to study *in vitro* culture conditions for plantlet growth and volatile constituent production in the leaves of *Ocimum basilicum*. Six experiments were investigated: different culture media (MS, B5 and WPM); different MS salt concentration (2MS, MS, MS ½ and ¼ MS); different segments and explant orientation (2MS, MS, MS ½ and ¼ MS); different growth regulators (auxins and cytokinins); developmental stage of the explant and comparison of the volatile fraction among mother plant, acclimatized and plantlet. MS basal medium was better for plantlet growth and B5 medium for menthol content. The medium MS and 2MS increased leaf menthol in *M. arvensis*, but reduced plantlet growth, therefore, we opted for the use of MS medium in the original formulation. For *in vitro* culture of *M. arvensis*, is recommended nodal segment inoculated in horizontal orientation by providing best explants growth and higher levels of menthol. The different growth regulators influenced development and chemical composition of plantlet, and BAP and NAA were responsible for the greatest variations in the chemical composition of the volatile fraction, especially in the levels of pulegone and menthol. *In vitro* plantlets *M. arvensis* can stay for up to 100 days in the same culture medium, it was observed that the longer the *in vitro* cultivation, the greater accumulation of menthol. *In vitro* leaves of *M. arvensis* tend to accumulate pulegone, but after acclimatization, the plant accumulates in menthol levels close to the mother plant.

Keywords: Micropropagation. Special metabolites. Japanese mint. Menthol.

1 INTRODUÇÃO

A *Mentha arvensis* L. conhecida popularmente como hortelã japonesa ou menta pertence à família Lamiaceae. É uma espécie de interesse econômico porque os seus óleos essenciais são uma rica fonte de mentol com várias aplicações industriais, como em produtos de higiene bucal, flavorizantes, aromatizantes de alimentos e bebidas, em perfumaria e produtos farmacêuticos (KUMAR et al., 2002).

O gênero *Mentha* compreende plantas conhecidas como hortelãs, as quais são muito cultivadas devido à produção de óleos essenciais produzidos por tricomas glandulares presentes nas folhas e caules das plantas (POOVAIAH et al., 2006). As inúmeras aplicações dos constituintes dos óleos das espécies do gênero *Mentha* pela indústria justificam o interesse pelos monoterpenos. Vários esforços têm sido feitos para aumentar o rendimento de monoterpenos em plantas, a fim de responder à demanda crescente mundial por aromatizantes, flavorizantes, fragrâncias e medicamentos (GARLET et al., 2007).

A propagação das hortelãs ocorre preferencialmente por rizomas ou estolões, pois em geral as hortelãs produzem sementes estéreis pela infertilidade do grão de pólen e têm alto número de ploidia (WANG et al., 2008). A necessidade de plantas para estudos químicos e a crescente demanda de matéria-prima para a indústria de fitoterápicos, é fundamental o desenvolvimento de técnicas que tenham como propósito a produção de mudas de qualidade. A micropropagação de plantas medicinais e aromáticas vem sendo difundida devido à possibilidade de produzir grande número de plantas homogêneas e com elevada qualidade fitoquímica (FLORES et al., 2006).

Estudos acerca do comportamento de plantas medicinais sob influência de diferentes condições ambientais na regulação biossintética do metabolismo secundário podem aumentar a produção de compostos de interesse, ou até

mesmo elevar a eficiência na forma de exploração dos mesmos, o que remete a uma aplicação prática que justifica a busca de conhecimento sobre o assunto (MORAIS, 2009).

A cultura de tecidos é uma técnica que permite o controle ambiental para o crescimento da planta, com isso possibilita estudo acerca de condições que viabilizem a produção do composto de interesse, tendo na micropropagação uma forma efetiva para multiplicação rápida de espécies nas quais é necessário obterem alta uniformidade de progênie. Então, há um grande interesse de utilização destas técnicas para ampliar a propagação de plantas medicinais e aromáticas (COSTA, 2006).

Os meios de cultura, por consistirem parte essencial desta técnica, necessitam de constante aprimoramento, buscando-se sempre o que proporcione melhor propagação *in vitro*, gerando maior número de mudas de qualidade e com menor custo (PASQUAL, 2001). Estudos mostram que a composição química do meio de cultura, juntamente com a adição de reguladores de crescimento tem influenciado consideravelmente na composição química das plantas medicinais (GOMES; FERREIRA, 2003; SILVA et al., 2005) e favorecido o crescimento e desenvolvimento dos explantes (BARREIRO, et al., 2006; BERTONI et al., 2006), sendo necessária estabelecer as condições ideais de cultivo *in vitro* que possibilitem o bom crescimento e a produção do composto químico de interesse do óleo essencial.

A realização desse estudo teve como objetivo identificar condições de cultivo *in vitro* que possibilitem melhor crescimento e produção de constituintes voláteis nas folhas de *Mentha arvensis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA, em Lavras-MG. Exsicatas da espécie estão depositadas no herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA, sob o registro nº 3636.

2.1 Fase de estabelecimento

Estolões de plantas matrizes do Horto de Plantas Medicinal do DAG/UFLA foram coletados e cultivados em substrato comercial em bandeja de isopor com 128 células para o crescimento das plantas. O material de propagação foi mantido em casa de vegetação até produzirem número suficiente de explantes que possibilitasse o início do estabelecimento.

Segmentos nodais foram utilizados como explantes para estabelecer as culturas primárias. Os segmentos foram cortados em tamanho aproximado de 1 cm com o auxílio de uma lâmina e lavados abundantemente com água corrente e sabão neutro. Em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50% e mantidos sob agitação constante, por 15 minutos, seguido de cinco lavagens em água destilada e autoclavada, sob capela de fluxo laminar.

Após a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 15 g/L de sacarose com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de 26 ± 1 °C.

Depois de estabelecidas, as plântulas foram multiplicadas no mesmo meio do estabelecimento e mantidas nas mesmas condições de cultivo para formação de um estoque de plântulas que foram usadas nos experimentos.

Plântulas estabelecidas *in vitro* em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 40 dias foram utilizadas como fonte de explante para a realização dos experimentos.

2.2 Condições gerais dos experimentos

Para a realização destes experimentos, foram realizados 6 experimentos descritos a seguir. Todos os experimentos tiveram as mesmas condições de cultivo. O meio de cultura foi solidificado com 6 g/L de ágar, o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Após o preparo, o meio foi autoclavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos. Depois da inoculação, os tubos foram fechados com tampas plásticas e vedados com parafilme, mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro, sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Aos 40 dias foram avaliados o número de folhas e nós; número, altura (cm) e biomassa seca das brotações (mg); número, comprimento (cm) e biomassa seca de raiz (mg), assim como a composição química da fração volátil das folhas. A altura da brotação e o comprimento das raízes foram determinados com o auxílio de uma régua. Para a altura, a medição foi feita da base da brotação até a gema apical. Para a determinação da biomassa seca, as brotações e as raízes foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a 40°C , por 5 dias. Após esse período, o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

2.2.1 Diferentes meios de cultura

Segmentos nodais com 1 cm foram inoculados em 3 meios de cultura: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG et al., 1968) e WPM (LOYD; MCCOWN, 1980).

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições, sendo 4 tubos por repetição, com um segmento nodal por tubo.

2.2.2 Variações da concentração dos sais do meio básico MS

Segmentos nodais com 1 cm foram inoculados em quatro variações do meio MS: o dobro das concentrações dos sais do MS (2MS), MS na sua formulação original (MS), metade da concentração dos sais do MS ($\frac{1}{2}$ MS) e um quarto da concentração dos sais do MS ($\frac{1}{4}$ MS). Todas as variações do MS foram suplementadas com 30 g/L de sacarose.

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições, sendo 4 tubos por repetição, com um segmento nodal por tubo.

2.2.3 Diferentes segmentos e orientação de inoculação

Para o terceiro experimento, foi utilizado o meio básico MS suplementado com 30 g/L de sacarose. Foi realizado um fatorial 2x2, sendo dois tipos de explante, segmento apical e o nodal, ambos com aproximadamente 1 cm, e duas as orientações de inoculação do explante: vertical e horizontal.

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições, sendo 4 tubos por repetição, com um segmento por tubo.

2.2.4 Efeito dos reguladores de crescimento

Segmentos nodais com 1 cm foram inoculados em meio básico MS suplementado com 30 g/L e diferentes reguladores de crescimento: 1) controle (ausência de reguladores), 2) AIA + BAP, 3) AIB + BAP, 4) ANA + BAP, 5) AIA + TDZ, 6) AIB + TDZ, 7) ANA + TDZ, 8) TDZ, 9) BAP, 10) AIA, 11) AIB e 12) ANA, sendo as auxinas e citocininas nas concentrações de 0,5 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹ respectivamente, totalizando 12 tratamentos.

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições, sendo 4 tubos por repetição, com um segmento nodal por tubo. Para este experimento também foi avaliada a porcentagem de calogênese, bem como a biomassa seca dos calos.

2.2.5 Estádio de desenvolvimento do explante

Segmentos nodais de plântulas estabelecidas foram utilizados para o fornecimento do explante. Os segmentos nodais foram cultivados em meio básico MS suplementado com 30 g/L de sacarose sem adição de reguladores de crescimento. Para a determinação da análise de crescimento foram realizadas avaliações de crescimento em intervalos de 10 dias até o 100º dia de cultivo.

2.2.6 Produção de constituintes voláteis na planta matriz, plântula *in vitro* e aclimatizada

Nesta etapa do trabalho foi feita a comparação da fração volátil entre a planta matriz, plântula *in vitro* e aclimatizada.

A planta matriz foi cultivada em canteiros a pleno sol. Plântulas estabelecidas *in vitro* em meio ½MS suplementado de 15g/L de sacarose, foram

utilizadas para a aclimatização. Plântulas com o sistema radicular desenvolvido foram retiradas dos tubos de ensaio e cuidadosamente lavadas com água corrente, para eliminar os resíduos do meio de cultura. Em seguida, foram transplantadas para bandejas com substrato comercial. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com nebulização intermitente, temperatura mantida em torno de 26 °C e sombreamento parcial obtido com sombrite de 70% de sombreamento por 15 dias. Logo após esse período foram transferidas para outra casa de vegetação sem sombrite e com sistema de fertirrigação (Quadro 1). Após 60 dias as folhas foram coletadas para a avaliação da fração volátil.

Para a avaliação *in vitro*, plântulas com 40 dias de cultivo em meio MS suplementado de 30 g/L de sacarose foram analisadas.

Componente	g/250 L
Nitrato de Cálcio	190
Sulfato de Amônia	56,25
MAP	27,5
Cloreto de Potássio	100
Sulfato de Magnésio	93,75
Tenso ferro	11
Sulfato de Manganês	1,68
Ácido Bórico	0,82
Sulfato de Zinco	0,14
Sulfato de Cobre	0,09
Molibdato de Sódio	0,0125

Quadro 1 Solução de fertirrigação.

2.3 Análise química da fração volátil

Para extração da fração volátil empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System* (CTC Analytics AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais, estabeleceram-se 30 min de incubação das amostras a 110 °C e a

temperatura da seringa foi programada para 120 °C. Folhas foram coletadas de plântulas cultivadas *in vitro* e secas em estufa de circulação de ar a 40 °C. Aliquotas de 20 mg de folhas secas, em duplicatas, que foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE até a análise; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica.

As análises químicas da fração volátil foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z*.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-WAX (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50.

Para os experimentos de diferentes meios, variação do MS, estágio de desenvolvimento do explante e comparação entre a planta matriz, *in vitro* e aclimatizada as temperaturas do injetor e a linha de transferência para o MS foram mantidas em 230 °C e 210 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 90°C, isotérmico por 3 min, seguido por uma rampa de temperatura de 10 °C/min até 120 °C, por 8 min, seguida de uma rampa de 20 °C/min até 200°C por 2 min.

Para os experimentos de diferentes segmentos e orientação de inoculação, bem como de diferentes reguladores de crescimento, as temperaturas do injetor e a linha de transferência para o MS foram mantidas em 200 °C e 250 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, isotérmico por 1,5 min, seguido por uma rampa de temperatura de 3°C/min até 180 °C, seguida de uma rampa de 10°C/min até 200 °C.

Os componentes foram identificados por comparação de seus índices de retenção relativos calculados com índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007).

Os índices de retenção (IR) foram calculados através da coinjeção com a mistura de hidrocarbonetos, C₈-C₂₀ (Sigma, EUA), e com a aplicação da equação de Van Den Dool e Kratz (1963).

2.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diferentes meios de cultura

Os diferentes meios não apresentaram diferenças estatísticas para número de nós e brotações, já as maiores alturas foram observadas nos meios WPM e MS, sendo o MS a apresentar maior número de folhas e biomassa seca de brotação (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Bertoni et al. (2006) no cultivo *in vitro* de *Calendula officinalis* L., onde os diferentes meios testados não apresentaram diferença para número de brotações e número de folhas, mas o meio MS proporcionou maior incremento na altura das brotações.

Com relação à formação do sistema radicular adventício, não houve diferença para o número de raízes, mas as de maior comprimento foram

formadas nos meios MS e WPM, sendo o WPM o meio de maior incremento de biomassa seca (Tabela 1). Estudo realizado por Costa et al. (2007) mostrou que diferentes meios não influenciaram no desenvolvimento *in vitro* de *Lippia sidoides*.

Tabela 1 Média do número de folhas (NF), nós (NN); número (NB), altura (AB), biomassa seca das brotações (BSB); número (NR), comprimento (CR) e biomassa seca de raiz (BSR) de *Mentha arvensis* em diferentes meios de cultura aos 40 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Meios de cultura	NF	NN	NB	AB (cm)	BSB (mg)	NR	CR (cm)	BSR (mg)
MS	23a	6a	2a	3,01a	7,18a	6a	2,64a	1,00b
B5	21b	6a	2a	2,35b	6,34b	5a	2,36b	1,12b
WPM	20b	6a	2a	2,82a	6,67b	5a	2,41a	1,74a
CV	9,80	13,98	0,00	22,42	22,15	19,12	21,04	26,16

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Na Figura 1 observa-se a plântula cultivada em diferentes meios de cultura e a maior ramificação das raízes no meio WPM. No meio WPM obteve-se maior biomassa seca de raiz, isto se deve devido a menor concentração de sais neste meio e de nitrogênio (KANASHIRO et al., 2007). O meio WPM contém 2,68 g/L de sais, o B5 contém 3,28 g/L e MS com 4,63 g/L, ou seja, o meio WPM tem apenas 54,65% de sais do MS e 77,05% do B5. Em relação à concentração de nitrogênio o meio WPM tem 24,49% em relação ao meio MS e 54,95% do meio B5.



Figura 1 Plântulas de *Mentha arvensis* cultivadas *in vitro* em diferentes meios de cultura aos 40 dias e detalhes do enraizamento, maior ramificação das raízes no meio WPM (seta). UFLA, Lavras, MG, 2013.

Foram identificados 18 constituintes químicos que representam mais de 94% da composição química da fração volátil nas plântulas cultivadas *in vitro* nos meios MS, B5 e WPM (Tabela 2).

Tabela 2 Constituição química da fração volátil de plântulas de *Mentha arvensis* no cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM). UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	MS	B5	WPM
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
α-pineno	1033	0,77±0,42	0,38±0,00	tr
β-pineno	1129	0,94±0,04	0,87±0,02	1,11±0,16
sabineno	1135	0,50±0,07	0,41±0,01	0,56±0,07
mirceneno	1165	0,41±0,06	0,38±0,01	0,41±0,02
limoneno	1216	1,77±1,00	1,03±0,11	0,99±0,05
1,8-cineol	1229	0,16±0,01	0,13±0,00	0,19±0,02
3-octanol	1398	0,23±0,05	0,13±0,00	0,28±0,00
mentona	1477	3,43±0,64	5,70±0,65	3,51±0,85
mentofurano	1495	0,15±0,02	nd	0,21±0,02
iso-mentona	1506	0,62±0,10	0,75±0,09	0,57±0,27
linalol	1547	0,76±0,06	0,52±0,00	0,72±0,02
iso-pulegol	1579	1,08±0,42	1,01±0,09	0,82±0,05
iso-pulegona	1593	0,32±0,05	0,28±0,03	0,53±0,03
E-cariofileno	1604	0,82±0,04	1,15±0,12	0,69±0,13
mentol	1643	27,49±1,34	46,05±4,95	19,55±5,81
pulegona	1649	56,40±0,50	37,08±5,49	64,21±6,26
p-ment-1-en-ol	1703	tr	nd	0,14±0,01
germacreno D	1711	0,17±0,01	0,12±0,00	0,18±0,01
Total identificado (%)		96,02	95,99	94,66
Número de compostos		18	16	18

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX.

DP: desvio-padrão (n=2). nd = não detectado; tr = traço (≤0,01%).

Analisando os três constituintes mentona, o mentol e a pulegona corresponderam mais de 87% da área relativa dos picos (Tabela 3). Os maiores teores de mentol (46,05±4,95%) e mentona (5,70±0,65%) foram observados nos meios B5, já a pulegona apresentou maior teor no meio WPM (64,21±6,26%). O meio MS apresentou teores intermediários, com 27,49±1,34% de mentol e 56,40±0,50% de pulegona. A produção de mentol no MS foi baixa comparada a obtida por Arrigoni-Blank et al. (2011) que obtiveram 69,07% desse constituinte em plântulas de *M. arvensis* cultivadas *in vitro* no mesmo meio de cultura.

Tabela 3 Teores dos três constituintes da fração volátil em plântulas *in vitro* de *Mentha arvensis* cultivadas em diferentes meios de cultura (MS, B5 e WPM). UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	MS	B5	WPM
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
Mentona	1477	3,43±0,64	5,70±0,65	3,51±0,85
Mentol	1643	27,49±1,34	46,05±4,95	19,55±5,81
Pulegona	1649	56,40±0,50	37,08±5,49	64,21±6,26
Total identificado (%)		87,32	88,83	87,27

^aÍndice de retenção relativo a série *n*-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX.

Na síntese do óleo essencial de *Mentha piperita*, a (+)-pulegona é a precursora do mentol, considerado o componente mais significativo dos óleos de *Mentha* spp. Dependendo das condições ambientais, a (+)-pulegona pode reduzir a (-)-mentona e sintetizar mentol, através da pulegona redutase, ou oxidar a (+)-mentofurano, pela mentofurano sintase (MAHMOUD; CROTEAU, 2003). Com base na biossíntese desses constituintes, parece que a pulegona redutase tem sua atividade enzimática aumentada nas condições de cultivo propiciadas pelo meio B5, ao contrário do que pôde ser observado com o meio WPM. Outro fato observado foi que mentofurano não foi detectado no meio B5, reforçando o fato das condições desse meio aumentarem a atividade enzimática da pulegona redutase.

3.2 Variações da concentração dos sais do meio básico MS

A concentração de sais no meio MS influenciou o crescimento do explante de *M. arvensis* (Tabela 4). Para o número de folhas e nós, observou-se um melhor crescimento nos meios MS, ½MS e ¼MS, não havendo diferença significativa para número de brotações entre os tratamentos. Maiores alturas foram observadas no meio que utilizou ¼ dos sais do MS, em contrapartida, maiores concentrações de sais apresentaram efeito negativo para essa variável, já com relação à biomassa seca de brotação, o meio MS foi superior.

Tabela 4 Média do número de nós (NN), número (NB), altura (AB) e biomassa seca das brotações (BSB), número (NR), comprimento (CR) e biomassa seca de raiz (BSR) de *M. arvensis* nas variações do meio MS aos 40 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Variações do MS	NF	NN	NB	AB (cm)	BSB (mg)	NR	CR (cm)	BSR (mg)
2 MS	14 b	4 b	2a	1,57 c	5,06 c	2 c	1,96 b	0,23 b
MS	22 a	6 a	2a	2,80 b	7,01 a	6 b	2,59 a	1,10 a
½MS	23 a	6 a	2a	2,96 b	6,24 b	7 a	2,46 a	1,23 a
¼MS	22 a	6 a	2a	4,35 a	5,90 b	7 a	2,56 a	1,20 a
CV	14,96	10,91	0,00	16,63	22,78	18,02	22,94	32,30

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Os resultados indicam que a formulação padrão do meio básico MS seria o ponto de equilíbrio para o cultivo *in vitro* de *M. arvensis*, haja vista que baixas concentrações não incrementaram a biomassa seca final e elevadas concentrações reduzem o tamanho da plântula. Couto et al. (2004) trabalhando com porta-enxertos de *Prunus* sp. e Ribeiro et al. (2007) trabalhando com *Ocimum basilicum* mostraram que o meio MS na concentração total dos sais proporcionou o melhor desenvolvimento da plântula.

Maior número de raízes foi observado nos meios ½MS e ¼MS (Tabela 4). A redução dos sais do meio básico MS tem possibilitado a obtenção de resultados satisfatórios na indução de raízes adventícias *in vitro* para um significativo número de espécies, como pode ser observado nos trabalhos realizados com *Azadirachta indica* (CHATURVEDI et al., 2004), mas nem sempre a redução dos sais do meio básico é necessária para o enraizamento. Em *Mikania glomerata* Spreng as concentrações dos macronutrientes do meio MS, não apresentou diferença no número médio de raízes emitidas por explante (DINIZ et al., 2006). Já para *Calendula officinalis* L., a maior porcentagem de enraizamento (80%) e maior número de raízes (3,2 raízes/planta) ocorreram em meio ½MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de AIB (BERTONI et al., 2006).

Os meios MS, $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{4}$ MS apresentaram maiores comprimento e biomassa seca de raízes (Tabela 4), não havendo diferenças significativas. A influência da composição dos meios de cultura no processo de enraizamento adventício *in vitro*, está relacionada à concentração de sais minerais empregados no preparo do mesmo e a presença de reguladores vegetais (SOUZA; PEREIRA, 2007). De modo geral, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados no enraizamento de plântulas *in vitro* (PINTO; LAMEIRA, 2001).

Na Figura 2 observa-se o crescimento e o sistema radicular das plântulas. A maior concentração de sais (2MS) pode ter sido tóxica para o crescimento da brotação e das raízes. Esses resultados corroboram com Rossi et al. (2011) onde nas concentrações mais elevadas obtiveram menor altura e menor biomassa seca da parte aérea, não havendo desenvolvimento de raízes nas plântulas.

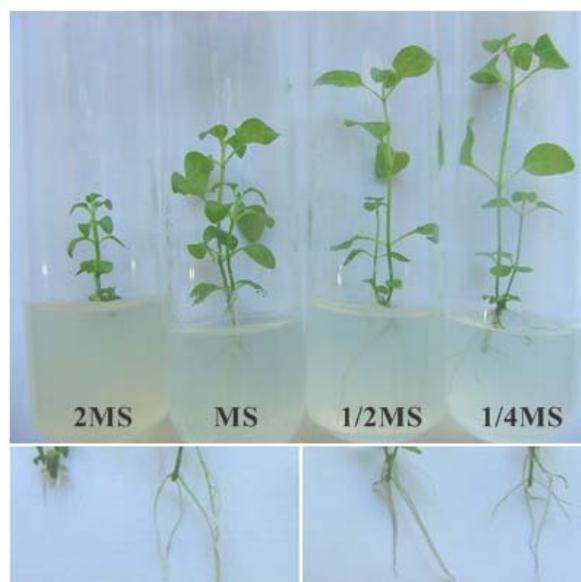


Figura 2 Plântulas de *Mentha arvensis* nas variações do meio MS e sistema radicular aos 40 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Os 22 constituintes químicos da fração volátil de plântulas cultivadas *in vitro* de *M. arvensis* encontram-se listados na Tabela 5 na ordem de eluição, compreendendo mais de 95% da composição química.

Com relação às diferenças qualitativas, não houve a presença do neomentol nos meios mais concentrados. Ausência de 1,8-cineol, 3-metilciclohexanona e mentofurano no meio 2MS, não sendo detectado o iso-mentol e a iso-pulegona no MS e o α -pineno e o isovalerato de etila no $\frac{1}{4}$ MS (Tabela 5).

É possível que as diferenças nas concentrações dos sais do meio MS atuem de forma a influenciar as atividades enzimáticas envolvidas na produção de mentol, favorecendo ou não a sua biossíntese. Conforme Davis et al. (2005) a biossíntese de mentol e seus isômeros é NADPH-dependente, um importante cofator enzimático nitrogenado. Comparando as formulações desses meios, pode ser que esse fenômeno tenha relação com a concentração da fonte de nitrogênio, pois no meio 2MS há uma grande quantidade desse elemento químico.

Tabela 5 Constituição química da ração volátil de plântulas de *Mentha arvensis* no cultivo *in vitro* na variação da concentração do meio MS. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	2MS	MS	½MS	¼MS
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
α-pineno	1068	0,66±0,04	1,09±0,00	0,81±0,45	nd
isovalerato de etila	1086	0,17±0,02	0,42±0,10	0,27±0,11	nd
3-careno	1138	0,90±0,04	1,52±0,02	1,49±0,24	1,82±0,07
mirreno	1174	0,38±0,04	0,46±0,00	0,44±0,05	0,49±0,23
limoneno	1222	3,44±1,76	1,06±0,36	1,18±0,05	1,17±0,31
1,8-cineol	1233	nd	0,18±0,01	0,15±0,02	0,18±0,01
3-metil-ciclohexanona	1352	nd	0,17±0,02	0,19±0,01	0,25±0,04
3-octanol	1399	0,12±0,03	0,23±0,00	0,18±0,00	0,20±0,01
mentona	1479	3,09±1,16	1,60±1,15	1,23±0,02	1,92±0,08
mentofurano	1502	nd	0,12±0,01	nd	0,17±0,13
iso-mentona	1507	0,71±0,29	0,51±0,00	0,24±0,00	nd
linalol	1547	0,74±0,03	0,80±0,01	0,63±0,00	0,62±0,01
iso-pulegol	1580	0,39±0,10	1,22±0,39	0,94±0,05	0,78±0,05
iso-pulegona	1594	0,14±0,07	nd	0,38±0,01	0,44±0,06
iso-mentol	1604	0,57±0,24	nd	0,24±0,02	0,30±0,12
neo-mentol	1606	nd	nd	0,19±0,01	0,19±0,01
mentol	1643	30,90±4,66	19,10±2,49	10,60±1,11	13,88±5,00
pulegona	1651	55,32±8,41	68,14±2,89	77,08±1,39	71,62±5,55
p-ment-1-en-ol	1704	0,14±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,10±0,00
germacreno D	1716	0,26±0,09	0,29±0,06	0,25±0,00	0,27±0,05
1,3-isopropenil-5-metil-1-ciclohexeno	1748	0,22±0,07	0,32±0,02	0,35±0,03	0,29±0,00
iso-limoneno	1753	0,17±0,06	0,24±0,02	0,27±0,02	0,22±0,01
Total identificado (%)		98,30	97,57	97,21	95,75
Número de compostos		18	19	21	19

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX. DP: desvio padrão. nd = não detectado.

O mentol e a pulegona foram os constituintes químicos com maior teor. (Tabela 6). O meio 2MS apresentou menor número de compostos, sendo o ½MS a ter maior quantidade de constituintes. A variação do MS interferiu na síntese dos constituintes, pois no dobro da concentração dos sais que houve um decréscimo no teor de pulegona (55,32±8,41%) e aumento nos teores de mentol

(30,90±4,66%) e limoneno (3,44±1,76), já o uso de ½MS incrementou os teores de pulegona (77,08±1,39%) e reduziu o de mentol (10,60±1,11%).

Tabela 6 Constituintes de maior teor em plântulas *in vitro* de *Mentha arvensis* cultivadas em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	2MS	MS	½MS	¼MS
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
Mentol	1643	30,90±4,66	19,10±2,49	10,60±1,11	13,88±5,00
Pulegona	1651	55,32±8,41	68,14±2,89	77,08±1,39	71,62±5,55
Total identificado (%)		86,22	87,24	87,68	85,5

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX.

Estudos indicam que o principal determinante na produção de monoterpenos em *Mentha* seja a taxa de biossíntese, definida pelos níveis regulados de desenvolvimento das enzimas biossintéticas responsáveis e seus substratos correspondentes (TURNER et al., 2000). Isso foi constatado por Gershenzon et al. (2000), que verificaram a existência de correlação entre as atividades *in vitro* e *in vivo* para oito enzimas da biossíntese do mentol.

3.3 Diferentes segmentos e orientação de inoculação

A interação influenciou significativamente a altura de brotação, número e comprimento de raízes (Tabela 7), as demais variáveis foram analisadas separadamente. Observa-se que o segmento nodal apresentou maiores valores da altura para as duas orientações de inoculação. Trabalho semelhante realizado por Pereira et al. (2006) indica que maior altura de plântulas foi observada em explantes de *Uncaria guianensis* inoculados na horizontal.

Com relação ao número de raízes, o segmento apical inoculado na posição horizontal proporcionou maiores valores para esta variável (Figura 3); é provável que as auxinas endógenas presentes nesse tipo de explante tenham

influenciado na produção do sistema radicular, em contrapartida, o segmento nodal inoculado horizontalmente proporcionou maiores comprimento de raízes.

Tabela 7 Média da altura da brotação (AB); número (NR) e comprimento de raízes (CR) de *Mentha arvensis* na interação de diferentes segmentos e orientação de inoculação (vertical-V e horizontal- H) aos 40 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Segmento	AB (cm)		NR		CR (cm)	
	V	H	V	H	V	H
Apical	3,31 aB	3,37 aB	5 bA	7 aA	3,44 aA	3,66 aB
Nodal	4,11 bA	5,52 aA	5 aA	5 aB	3,41 aA	4,14 aA
CV	10,88		17,37		14,20	

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Minúsculo na linha, maiúsculo na coluna.



Figura 3 Plântulas de *Mentha arvensis* no cultivo *in vitro* com diferentes segmentos e orientação de inoculação (T1: apical x vertical; T2: apical x horizontal; T3: nodal x vertical e T4: nodal x horizontal). UFLA, Lavras, MG, 2013.

Analisados separadamente, o segmento nodal proporcionou maior formação de folhas (Tabela 8), bem como para número de brotos e incremento da biomassa seca de brotação, não havendo diferença estatística para número de nós e biomassa seca de raízes. Muitos trabalhos utilizam segmentos nodais como fonte de explantes, tendo como principal objetivo avaliar o potencial destes

explantes para a obtenção de clones, pois originam plantas devido à quebra da dormência da gema lateral (FAQUIM et al., 2007).

A orientação de inoculação não influenciou nas variáveis números de folhas, brotações e nós (Tabela 8). Para as variáveis biomassa seca de brotação e raízes, a posição horizontal apresentou maiores ganhos. Dados que discordam de Pereira et al. (2006) nos quais observaram que posição de inoculação do explante da espécie *Uncaria guianensis* demonstrou exercer influência no número médio de brotações/explante, assim como no número de gemas iniciais.

No cultivo *in vitro* de macieira, Erig e Schuch (2002) observaram maior número de brotações, o maior número de gemas e a maior taxa de multiplicação foram obtidos com o explante na orientação horizontal no meio de cultura, não havendo diferença significativa quanto à orientação vertical e horizontal do explante no meio de cultura para a altura da brotação maior.

Tabela 8 Média do número de folhas (NF), nós (NN), número (NB), biomassa seca de brotação (BSB) e raiz (BSR) de *M. arvensis* com diferentes tipos de segmentos e orientação de inoculação aos 40 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Segmento	NF	NN	NB	BSB (mg)	BSR (mg)
Apical	15 b	7 a	1 b	8,57 b	1,61 a
Nodal	26 a	7 a	2 a	12,04 a	1,67 a
Orientação	NF	NN	NB	BSB (mg)	BSR (mg)
Vertical	20 a	7 a	2 a	9,24 b	1,36 b
Horizontal	21 a	7 a	2 a	11,39 a	1,93 a
CV	11,57	7,75	14,03	15,76	21,08

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A análise da constituição química da fração volátil revelou a presença de 17 compostos nas plântulas de *M. arvensis*, listados por ordem de eluição na Tabela 9, dos quais representam mais de 98% da fração volátil. Não houve diferenças qualitativas entre os tratamentos, havendo a presença dos 17 constituintes em todos eles, porém os tratamentos influenciaram os teores em

termos quantitativos, sendo a pulegona o constituinte de maior acúmulo em todos os tratamentos (70,61±7,26%-81,57±0,00%).

Tabela 9 Constituição química da fração volátil de plântulas de *Mentha arvensis* no cultivo *in vitro* com diferentes segmentos e orientação de inoculação (T1: apical x vertical; T2: apical x horizontal; T3: nodal x vertical e T4: nodal x horizontal). UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	T1	T2	T3	T4
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
isovarelato de etila	1081	0,57±0,13	0,54±0,00	0,27±0,14	0,38±0,21
β-pineno	1113	0,91±0,04	1,06±0,00	0,92±0,09	0,96±0,10
β-felandreno	1123	0,52±0,01	0,59±0,00	0,51±0,07	0,55±0,03
β-mirceno	1163	0,46±0,02	0,54±0,00	0,45±0,06	0,44±0,07
limoneno	1202	3,58±0,96	4,77±0,00	1,83±0,61	1,62±0,72
1,8-cineol	1213	0,14±0,01	0,16±0,00	0,12±0,02	0,14±0,01
3-octanol	1400	0,23±0,00	0,24±0,00	0,20±0,10	0,27±0,07
mentona	1458	2,17±1,33	0,91±0,00	1,90±0,60	1,20±0,47
iso-mentona	1486	0,42±0,23	0,13±0,00	0,27±0,05	0,47±0,44
linalol	1553	0,73±0,01	0,71±0,00	0,62±0,12	0,69±0,05
iso-pulegona	1565	0,47±0,06	0,62±0,00	0,46±0,12	0,50±0,17
iso-pulegol	1570	0,96±0,00	0,83±0,00	1,05±0,06	0,91±0,14
cariofileno	1587	0,20±0,03	0,19±0,00	0,15±0,00	0,19±0,04
neo-mentol	1598	0,34±0,15	0,09±0,00	0,35±0,12	0,40±0,37
pulegona	1639	70,61±7,26	81,57±0,00	71,33±4,66	70,95±15,58
mentol	1643	15,88±6,37	5,23±0,00	17,54±5,31	18,24±15,51
iso-limoneno	1733	0,24±0,00	0,17±0,00	0,29±0,09	0,24±0,04
Total identificado (%)		98,44	98,34	98,26	98,13
Número de compostos		17	17	17	17

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX. DP: desvio padrão (n=2).

Conforme Croteau et al. (2005), o mentol, tem a tendência de aumentar a concentração no decorrer do ciclo de cultivo em função da enzima mentona-reductase, é possível que as plântulas cultivadas *in vitro* necessitassem de mais tempo para que esta enzima atuasse convertendo a pulegona em mentona. Essa informação é confirmada por Souza et al. (2006), que no cultivo de *Mentha*

piperita hidropônica obtiveram apenas 5-8% de mentol, atribuindo este resultado à idade da planta (50 dias de cultivo).

Das diferenças quantitativas, as mais expressivas foram relacionadas aos majoritários limoneno, mentol e pulegona. O tratamento 2 (apical x horizontal) favoreceu o maior acúmulo de pulegona em detrimento ao mentol que obteve menor teor ($5,23 \pm 0,00\%$). Maiores teores de mentol ($18,24 \pm 15,51\%$) foram detectados no segmento nodal inoculado horizontalmente. Os tratamentos que utilizaram o segmento apical independente da posição de inoculação apresentaram maiores teores de limoneno ($3,58 \pm 0,96\%$ - $4,77 \pm 0,00\%$).

Os valores dos constituintes químicos desse estudo discordam de Paulus et al. (2007), que indicam o mentol como componente presente em maior quantidade no óleo essencial das espécies de *Mentha*, porém não é a única substância que define a sua qualidade. Segundo os autores, outras substâncias como limoneno e mentona, mesmo em pequenas quantidades, podem alterar as qualidades organolépticas do óleo essencial, ou ainda terem valor comercial por serem utilizadas nas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

3.4 Efeito dos reguladores de crescimento

Os diferentes reguladores de crescimento testados influenciaram significativamente nas variáveis avaliadas. Maiores números de folhas foram observados nos tratamentos que utilizaram a combinação de AIA + TDZ, TDZ e ANA (Tabela 10). A combinação ANA + TDZ foi a que proporcionou menor número de folhas. Resultados que discordam de Arrigoni-Blank et al. (2011), que testando diferentes reguladores obtiveram maior média de número de folhas de *M. arvensis* em com a utilização de $0,77 \text{ mg L}^{-1}$ AIA.

Tabela 10 Média do número de folhas (NF), nós (NN) e brotações (NB), altura (AB) e biomassa seca de brotação (BSB); porcentagem de calogênese (%C), biomassa seca de calos (BSC); do número (NR), comprimento (CR) e biomassa seca de raiz (BSR) de *M. arvensis* aos 40 dias de cultivo *in vitro* em diferentes reguladores de crescimento. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Trata. 0,5 + 2,0 (mg/L)	NF	NN	NB	AB (cm)	BSB (mg)	%C	BSC (mg)	NR	CR (cm)	BSR (mg)
AIA+BAP	22 b	6 b	2 c	2,4 c	9,6 c	0,0 d	0,0 d	4 c	2,9 b	3,3 b
AIB+BAP	20 b	6 b	2 c	2,5 c	6,4 d	0,0 d	0,0 d	2 d	3,0 b	1,9 c
ANA+BAP	24 b	6 b	3 b	3,1 b	8,40 c	53,6 c	1,8 d	4 c	3,0 b	4,0 a
AIA+TDZ	28 a	4 d	4 a	1,8 d	10,98 c	89,3 b	19,6 a	0 e	0,0 d	0,0 e
AIB+TDZ	23 b	4 d	4 a	1,0 e	8,6 c	64,3 c	8,1 b	0 e	0,0 d	0,0 e
ANA+TDZ	14 c	2 e	2 c	0,6 e	6,9 d	100 a	6,7 b	0 e	0,0 d	0,0 e
TDZ	29 a	4 d	3 b	1,5 d	13,7 b	64,3 c	4,7 c	0 e	0,0 d	0,0 e
BAP	22 b	5 c	3 b	2,4 c	9,8 c	0,0 d	0,0 d	2 d	2,5 b	2,7 b
AIA	23 b	6 b	2 c	3,6 b	10,1 c	0,0 d	0,0 d	6 b	1,6 c	0,9 d
AIB	24 b	7 a	2 c	6,0 a	12,6 b	0,0 d	0,0 d	7 a	1,4 c	1,2 d
ANA	28 a	7 a	2 c	5,2 a	20,8 a	0,0 d	0,0 d	7 a	1,4 c	4,1 a
Controle	21 b	6 b	2 c	2,8 c	7,6 d	0,0 d	0,0 d	5 b	3,4 a	1,5 c
CV	13,8	11,4	19,6	17,8	17,0	20,10	23,5	21,6	23,7	23,06

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Para número de nós, os maiores valores foram observados nas auxinas AIB e ANA, assim como a maior altura da parte aérea. Fato já esperado devido às auxinas serem responsáveis pelo alongamento celular (TAIZ; ZEIGER, 2004), proporcionando maiores valores para essas variáveis. As combinações AIA + TDZ e AIB + TDZ induziram maior número de brotações. Dados que corroboram com Ali et al. (2004) que na utilização de segmentos nodais de *M. arvensis*, em meio MS, suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 1,0 mg L⁻¹ de BAP, obtiveram maior número brotações por explante, mostrando que a combinação de citocininas e auxinas viabilizam a indução de brotação, informação reforçada por Chishti et al. (2006) que obtiveram uma melhor multiplicação de brotos de *M. arvensis*, utilizando o meio MS suplementado de 2 mg L⁻¹ de BAP e 0,8 mg L⁻¹ de AIA.

A utilização de ANA incrementou a biomassa seca de brotação, o uso de AIB + BAP, ANA + TDZ, assim como o controle, tiveram os piores resultados para essa variável.

Os dados relativos à calogênese indicam que a maior indução ocorreu com a utilização de ANA + TDZ, com 100% de formação de calos na base inferior do explante, porém a utilização de AIA + TDZ proporcionou maior incremento de biomassa seca de calos (Tabela 10).

O número de raízes produzidas na presença de AIB e ANA foram os maiores comparados com os outros tratamentos inclusive no controle (ausência de regulador), não havendo formação de raízes na presença de TDZ, isso pode ter ocorrido devido as citocininas serem hormônios associados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, participando no controle da divisão celular (NISHIMURA et al., 2004), não estando relacionados a indução do enraizamento adventício.

Na literatura encontram-se trabalhos relatando a importância da adição de reguladores para o enraizamento *in vitro*, e em determinados casos, havendo apenas o enraizamento na presença do regulador, porém, conforme os dados apresentados, a adição de reguladores incrementou o enraizamento, mas não foi determinante para a produção de raízes haja vista que na ausência de reguladores houve a formação do sistema radicular adventício.

Estudo realizado por Garlet et al. (2011) demonstraram que plantas de *Mentha x gracilis* apresentaram maiores comprimentos de raízes e percentagem de enraizamento quando cultivadas em meio isento de reguladores de crescimento, bem como nos meios acrescidos de cinetina e naqueles contendo a menor concentração de BAP ou TDZ, porém a adição de ANA incrementou a biomassa seca de raízes. Resultados que corroboram com Bona et al. (2011), onde a utilização de ANA também favoreceu o enraizamento e aumentou a percentagem de enraizamento em *Lavandula angustifolia*.

Na Figura 4 observa-se o comportamento do explante no meio de cultura suplementado com diferentes reguladores de crescimento.

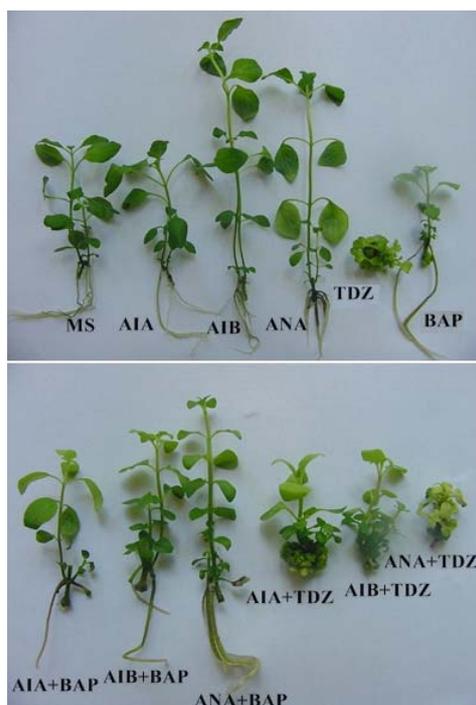


Figura 4 Plântulas de *Mentha arvensis* cultivadas *in vitro* suplementado com diferentes reguladores de crescimento aos 40 dias. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Na análise da constituição química, foram identificados 21 compostos, os quais se encontram listados por ordem de eluição na Tabela 11, representando mais de 97% da composição da fração volátil. Os reguladores de crescimento influenciaram na composição química das plântulas. Nota-se que os teores dos constituintes mentona, pulegona e mentol apresentaram diferenças de acordo com o regulador de crescimento adicionado ao meio de cultura.

O acréscimo de reguladores de crescimento ao meio de cultura também influenciou na composição de *Melissa officinalis* L. cultivada *in vitro* em trabalho realizado por Silva et al. (2005); os autores observaram que o meio MS

suplementado com os reguladores de crescimento AIA e BAP resultaram em aumentos de 1,7 e 2,2 vezes na proporção de neral e geranial, respectivamente.

A mentona alcançou maior teor ($5,41 \pm 1,11\%$) com a utilização do BAP e menores na presença de ANA ($0,68 \pm 0,16\%$), mostrando que esta auxina inibiu a produção de mentona, já com relação à pulegona foram observados o elevado teor de $88,50 \pm 0,35\%$ na presença do mesmo regulador, sendo o BAP o responsável pela diminuição com teor de $39,55 \pm 5,04\%$, em contrapartida a mesma citocinina apresentou efeito positivo no teor do mentol ($40,81 \pm 2,65\%$), sendo este o maior teor de mentol em todos os tratamentos. O limoneno também foi bastante influenciado pelo uso dos reguladores, apresentando máximo de $4,49 \pm 0,88\%$ na presença de BAP e mínimo de $1,18 \pm 0,33\%$ na presença de ANA.

De forma geral percebe-se que a citocinina BAP e a auxina ANA quando acrescentadas ao meio de cultura de forma isolada foram os reguladores de crescimento que mais influenciaram na biossíntese dos constituintes químicos, seja para mais ou para menos, contudo, percebe-se que o uso da citocinina eleva a biossíntese do mentol. Estudando a produção de óleo essencial de brotos de *Salvia officinalis in vitro*, Gomes e Ferreira (2003) utilizaram como meio de cultura básico o MS, suplementado com diferentes combinações de citocininas, e observaram que o tipo e a concentração da citocinina influenciaram o acúmulo de óleo essencial.

A utilização de AIA, de forma isolada, pouco influenciou quantitativamente para o mentol e a pulegona comparado com o controle (MS). Com relação às diferenças qualitativas, as combinações AIB + BAP e ANA + BAP, assim como apenas o BAP apresentaram todos os constituintes químicos, sendo a auxina ANA a ter menor número de compostos detectados. A pinocarvona e iso-pulegona não foram detectadas na presença do TDZ e a utilização das auxinas isoladas inibiu a produção da iso-pulegona. Sudriá et al. (1999), estudando a influência de reguladores de crescimento no conteúdo de

óleo essencial de plântulas de *Lavandula dentada*, concluíram que o meio que continha 0,1 mg L⁻¹ de BA (benziladenina) proporcionou maior conteúdo de óleo.

Tabela 11 Constituição química da fração volátil de plântulas de *M. arvensis* no cultivo *in vitro* contendo diferentes reguladores de crescimento. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	MS	AIA+BAP	AIB+BAP	ANA+BAP
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
isovarelato de etila	1080	0,15±0,02	0,08±0,00	0,12±0,02	0,13±0,03
β -pineno	1112	1,01±0,04	1,07±0,08	0,96±0,03	0,94±0,03
β -felandreno	1123	0,57±0,03	0,64±0,01	0,57±0,01	0,58±0,02
β -mircenol	1162	0,47±0,01	0,77±0,05	0,61±0,03	0,65±0,01
limoneno	1202	2,21±0,33	3,55±0,63	3,60±0,61	3,13±0,24
1,8-cineol	1212	0,17±0,01	0,19±0,00	0,17±0,01	0,18±0,00
3-octanol	1400	0,26±0,00	tr	0,40±0,03	0,45±0,01
mentona	1458	3,45±1,31	3,81±0,99	4,00±1,16	2,52±0,66
iso-mentona	1486	0,99±0,07	0,80±0,29	1,20±0,34	0,85±0,42
cis-3-hexenilisovalerato	1489	tr	tr	0,09±0,00	0,10±0,02
linalol	1552	0,81±0,00	0,56±0,08	0,61±0,06	0,67±0,01
pinocarvona	1560	nd	nd	0,08±0,01	tr
iso-pulegona	1565	0,39±0,00	0,36±0,10	0,34±0,10	0,40±0,09
iso-pulegol	1569	0,90±0,01	0,71±0,01	0,69±0,00	0,65±0,06
cariofileno	1587	0,18±0,00	0,22±0,01	0,19±0,00	0,20±0,01
neo-mentol	1598	0,81±0,03	0,65±0,23	0,88±0,28	0,59±0,26
pulegona	1639	54,00±2,46	56,98±9,93	48,00±12,19	61,46±11,70
mentol	1644	31,90±0,78	27,13±9,01	35,38±10,96	24,57±10,68
piperitona	1715	0,15±0,02	0,11±0,02	0,24±0,11	tr
não identificado	1729	0,25±0,03	0,17±0,01	0,19±0,03	0,17±0,02
iso-limoneno	1733	0,22±0,03	0,19±0,00	0,20±0,04	0,19±0,02
Total identificado (%)		98,87	97,97	98,52	98,41
Número de compostos		20	20	21	21

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX. DP: desvio-padrão (n = 2). nd = não detectado. tr = traço (≤0,01%).

Tabela 11, continuação

COMPOSTOS	IR ^a	AIA+TDZ	AIB+TDZ	ANA+TDZ	TDZ
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
isovarelato de etila	1080	nd	tr	nd	nd
β -pineno	1112	0,96±0,05	0,89±0,04	0,83±0,07	1,02±0,01
β -felandreno	1123	0,58±0,02	0,56±0,03	0,47±0,02	0,59±0,01
β -mirceno	1162	0,64±0,00	0,61±0,08	0,52±0,07	0,64±0,02
limoneno	1202	3,56±0,15	3,11±1,40	2,43±0,03	4,32±0,06
1,8-cineol	1212	0,18±0,00	0,17±0,01	tr	0,18±0,00
3-octanol	1400	0,34±0,03	0,36±0,03	0,28±0,04	0,30±0,03
mentona	1458	2,88±1,33	2,51±0,32	4,69±0,43	1,38±1,09
iso-mentona	1486	0,60±0,30	0,73±0,37	0,37±0,19	tr
cis-3-hexenilisovalerato	1489	0,72±0,07	0,70±0,01	0,43±0,05	0,73±0,09
linalol	1552	0,50±0,06	0,47±0,09	0,39±0,05	0,63±0,03
pinocarvona	1560	nd	nd	nd	nd
iso-pulegona	1565	nd	nd	nd	nd
iso-pulegol	1569	0,66±0,06	0,68±0,01	0,87±0,00	0,71±0,04
cariofileno	1587	0,16±0,04	0,14±0,01	nd	0,15±0,04
neo-mentol	1598	0,32±0,16	0,44±0,25	0,29±0,17	tr
pulegona	1639	72,68±8,67	67,62±9,77	73,68±7,65	83,88±4,18
mentol	1644	13,75±6,89	19,13±10,43	13,56±7,18	3,80±2,51
piperitona	1715	tr	tr	nd	nd
não identificado	1729	0,10±0,01	0,13±0,01	0,15±0,03	tr
iso-limoneno	1733	tr	0,13±0,01	0,15±0,02	tr
Total identificado (%)		98,64	98,39	99,1	98,33
Número de compostos		18	19	16	17

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcacos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX.

DP: desvio-padrão (n = 2). nd = não detectado. tr = traço (≤0,01%).

Tabela 11, conclusão

COMPOSTOS	IR ^a	BAP	AIA	AIB	ANA
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
isovarelo de etila	1080	0,13±0,00	0,31±0,14	nd	nd
β -pineno	1112	0,95±0,06	0,94±0,11	0,97±0,11	0,86±0,11
β -felandreno	1123	0,60±0,03	0,54±0,02	0,51±0,06	0,43±0,05
β -mirceno	1162	0,67±0,03	0,46±0,05	0,43±0,05	0,38±0,05
limoneno	1202	4,49±0,88	1,32±1,26	1,75±0,79	1,18±0,33
1,8-cineol	1212	0,18±0,01	0,16±0,01	0,15±0,01	nd
3-octanol	1400	0,36±0,03	0,41±0,17	0,20±0,06	tr
mentona	1458	5,41±1,11	1,96±0,25	3,13±1,90	0,68±0,16
iso-mentona	1486	1,53±0,17	1,01±0,62	0,57±0,29	nd
cis-3-hexenilisovalerato	1489	0,09±0,02	tr	0,70±0,03	0,45±0,06
linalol	1552	0,75±0,03	0,81±0,05	0,46±0,10	0,49±0,07
pinocarvona	1560	0,08±0,00	0,34±0,13	nd	nd
iso-pulegona	1565	0,31±0,00	nd	nd	nd
iso-pulegol	1569	0,58±0,03	0,83±0,11	0,87±0,03	1,00±0,01
cariofileno	1587	0,24±0,02	0,17±0,00	0,18±0,05	0,16±0,02
neo-mentol	1598	1,04±0,07	0,87±0,51	0,52±0,27	nd
pulegona	1639	39,55±5,04	53,81±18,34	66,12±12,35	88,50±0,35
mentol	1644	40,81±2,65	34,27±18,54	21,83±10,79	3,92±0,64
pipéritona	1715	0,35±0,07	tr	nd	nd
não identificado	1729	0,12±0,01	0,23±0,06	0,23±0,01	0,29±0,06
iso-limoneno	1733	0,13±0,01	0,23±0,05	0,20±0,01	0,21±0,05
Total identificado (%)		98,38	98,67	98,81	98,53
Número de compostos		21	20	17	14

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX.
DP: desvio-padrão (n = 2). nd = não detectado. tr = traço (≤0,01%).

3.5 Estádio de desenvolvimento do explante

Segundo Gondim et al. (2011), o conhecimento da curva de crescimento é importante na determinação das épocas em que a planta apresenta maior demanda por nutrientes, evitando-se assim, prováveis deficiências nutricionais que porventura venham a ocorrer durante o cultivo da cultura.

Após 100 dias de inoculação as plântulas apresentaram bom crescimento, apenas as folhas de algumas mais próximas às raízes sofreram senescência (Figura 5). Isto mostra que esta espécie se adapta bem as condições *in vitro*, podendo ser mantidas por maior período em um mesmo meio de cultura, diminuindo custos e número de repicagens.



Figura 5 Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *M. arvensis* pelo período de 100 dias. Tempo 1 = 10 dias, Tempo 2 = 20 dias, Tempo 3 = 30 dias, Tempo 4 = 40 dias, Tempo 5 = 50 dias, Tempo 6 = 60 dias, Tempo 7 = 70 dias, Tempo 8 = 80 dias, Tempo 9 = 90 dias, Tempo 10 = 100 dias.

No decorrer de 100 dias após a inoculação em meio de cultura, observou-se um comportamento linear crescente para as variáveis avaliadas, tanto para a parte aérea, quanto para o sistema radicular adventício. Aos dez dias de inoculação, as plântulas apresentavam valor médio de 6 folhas, ao final das avaliações, esse valor subiu para 37 (Tabela 12). O número de brotações se manteve constante (2), resultado já esperado, pois essa variável não costuma ser influenciada pelo tempo de cultivo.

Arrigoni-Blank et al. (2011), no cultivo *in vitro* da mesma espécie, avaliaram aos 35 dias após a inoculação, obtendo média de 14 folhas e 2 brotações por plântula, resultados semelhantes aos observados nesse estudo na mesma época de avaliação.

Maior tempo de inoculação incrementou a altura das plântulas, chegando ao valor médio de 12,47 cm, bem como para biomassa seca de brotação que chegaram a níveis de 38,48 mg. Essas variáveis estão intimamente interligadas, sendo proporcionais, observa-se que no período de avaliação, quanto maior a altura, maior o número de nós assim como a biomassa seca de brotação (Tabela 12).

Para número de raízes foi observado valores médios mínimos de 2 aos dez dias e máximo de 7 ao 100 dias, comprimento máximo de 4,88 cm e biomassa seca de 4,24 mg ao final das avaliações. Rossi et al. (2011) aos 45 dias de cultivo *in vitro* da mesma espécie em meio MS obteve número médio de 5 raízes por plântula com comprimento médio de 2,77 cm, valores próximos ao encontrado neste estudo na mesma época de avaliação.

Tabela 12 Média do número de folhas (NF), altura (AB) e biomassa seca de brotações (BSB), número (NR), comprimento (CR) e biomassa seca de raiz (BSR) de *M. arvensis* ao longo de 100 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Dias	NF	AB (cm)	BSB (mg)	NR	CR (cm)	BSR (mg)
10	6	0,64	0,69	2	0,73	0,07
20	15	1,79	2,20	4	2,48	0,67
30	15	2,77	5,62	4	2,61	0,78
40	19	4,32	8,94	5	3,24	1,37
50	22	5,42	12,64	6	3,24	2,21
60	25	7,81	18,64	6	3,32	2,58
70	30	8,65	22,95	6	4,52	3,42
80	31	9,23	24,67	6	4,10	3,33
90	34	9,16	30,16	7	4,15	3,29
100	37	12,47	38,48	7	4,88	4,24

Na Tabela 13 encontra-se listados por ordem de eluição os 18 constituintes químicos da fração volátil das folhas das plântulas cultivados ao longo de 100 dias, que representam mais de 91% da fração volátil. Das diferenças quantitativas, observa-se que os majoritários mentol e pulegona sofreram diferenças em seus teores no decorrer dos 100 dias.

Tabela 13 Constituição química da fração volátil de plântulas de *M. arvensis* no cultivo *in vitro* no decorrer de 100 dias. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	0	10	20	30
		Área%	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
α-pineno	1034	0,43	0,48±0,02	0,48±0,03	0,35±0,14
β-pineno	1129	1,04	1,02±0,09	1,15±0,02	0,71±0,25
sabineno	1135	0,5	0,47±0,06	0,57±0,03	0,35±0,12
mirceneno	1165	0,24	0,46±0,02	0,48±0,03	0,24±0,08
limoneno	1216	1,16	7,25±0,01	3,74±0,17	0,86±0,16
1,8-cineol	1229	0,15	0,16±0,01	0,35±0,24	tr
3-octanol	1398	0,15	tr	0,24±0,03	0,17±0,03
mentona	1477	1,32	0,18±0,04	1,53±0,07	1,85±0,60
mentofurano	1495	0,25	0,20±0,03	0,29±0,03	0,22±0,02
iso-mentona	1506	0,27	nd	0,25±0,01	0,44±0,04
linalol	1547	0,7	0,58±0,15	1,36±0,74	0,73±0,02
iso-pulegol	1579	0,77	0,82±0,63	0,65±0,00	0,66±0,02
iso-pulegona	1593	1,86	0,96±0,40	0,95±0,00	1,01±0,24
E-cariofileno	1604	0,4	nd	0,29±0,01	0,60±0,08
mentol	1642	8,71	0,57±0,01	6,03±0,25	17,51±3,10
pulegona	1649	73,23	81,23±1,16	75,81±0,77	67,74±3,62
p-ment-1-en-ol	1703	0,15	0,17±0,01	0,15±0,01	0,15±0,02
germacreno D	1711	nd	nd	nd	0,15±0,01
Total identificado (%)		91,34	94,55	94,32	93,74
Número de compostos		17	15	17	18

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX.
DP: desvio-padrão (n = 2). nd = não detectado. tr = traço (≤0,01%).

Tabela 13, continuação

COMPOSTOS	IR ^a	40	50	60	70
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
α-pineno	1034	tr	0,79±0,33	0,38±0,02	0,45±0,05
β-pineno	1129	0,93±0,02	0,95±0,05	0,85±0,12	0,89±0,07
sabineno	1135	0,47±0,01	0,54±0,03	0,49±0,10	0,51±0,05
mirceneno	1165	0,38±0,03	0,48±0,05	0,41±0,10	0,43±0,04
limoneno	1216	1,29±0,57	2,59±1,35	1,17±0,01	2,56±1,72
1,8-cineol	1229	0,16±0,00	0,17±0,00	0,16±0,01	0,15±0,02
3-octanol	1398	0,23±0,00	0,27±0,02	0,27±0,01	0,25±0,00
mentona	1477	2,78±1,16	5,00±1,64	2,93±0,17	4,62±3,23
mentofurano	1495	0,20±0,02	0,22±0,01	0,19±0,02	0,27±0,08
iso-mentona	1506	0,58±0,20	1,42±0,17	1,16±0,02	1,13±0,38
linalol	1547	0,74±0,03	0,87±0,05	0,80±0,00	0,83±0,02
iso-pulegol	1579	0,87±0,10	0,67±0,06	0,89±0,19	0,82±0,06
iso-pulegona	1593	0,68±0,03	0,31±0,10	0,41±0,25	0,28±0,02
E-cariofileno	1604	0,68±0,12	1,38±0,07	1,37±0,01	1,41±0,01
mentol	1642	20,59±4,65	44,89±0,63	47,80±1,15	48,18±1,34
pulegona	1649	63,42±6,23	35,49±3,17	36,19±1,04	32,31±5,68
p-ment-1-en-ol	1703	0,13±0,01	0,14±0,01	0,15±0,00	0,13±0,02
germacreno D	1711	0,17±0,01	0,27±0,03	0,25±0,05	0,29±0,02
Total identificado (%)		94,29	96,46	95,89	95,49
Número de compostos		18	18	18	18

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX.

DP: desvio padrão ($n = 2$); nd = não detectado; tr = traço ($\leq 0,01\%$).

Tabela 13, conclusão

COMPOSTOS	IR ^a	80	90	100
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
α -pineno	1034	tr	nd	tr
β -pineno	1129	0,91±0,03	0,99±0,01	0,83±0,05
sabineno	1135	0,52±0,00	0,56±0,03	0,52±0,01
mirceneno	1165	0,41±0,05	0,53±0,03	0,45±0,09
limoneno	1216	1,48±0,60	1,27±0,64	0,31±0,06
1,8-cineol	1229	0,17±0,01	0,18±0,00	0,15±0,01
3-octanol	1398	0,27±0,02	0,26±0,03	0,31±0,02
mentona	1477	5,29±0,90	4,57±1,06	1,84±1,06
mentofurano	1495	0,18±0,03	0,17±0,04	0,18±0,00
iso-mentona	1506	1,59±0,01	1,71±0,34	1,49±0,04
linalol	1547	0,86±0,03	0,81±0,11	0,78±0,04
iso-pulegol	1579	0,96±0,08	0,78±0,13	0,82±0,00
iso-pulegona	1593	0,20±0,03	0,10±0,05	nd
E-cariofileno	1604	1,72±0,19	1,87±0,24	2,09±0,05
mentol	1642	60,47±5,28	66,19±7,31	76,54±1,70
pulegona	1649	20,55±3,60	15,72±6,01	8,97±0,72
p-ment-1-en-ol	1703	0,15±0,01	0,15±0,01	0,14±0,00
germacreno D	1711	0,34±0,05	0,31±0,05	0,31±0,03
Total identificado (%)		96,07	96,15	95,76
Número de compostos		18	17	17

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX.

DP: desvio padrão ($n = 2$); nd = não detectado; tr = traço ($\leq 0,01\%$).

Os resultados indicam uma possível inibição na conversão de pulegona para mentol nos estágios iniciais da organogênese. Até o quadragésimo dia a pulegona apresentava maiores teores (63,42±6,23% - 81,23±1,16%) do que o mentol, a partir do quinquagésimo dia esse comportamento se inverteu, tendo um acréscimo crescente de mentol chegando ao teor de 76,54±1,70% no centésimo dia, a pulegona, no mesmo período, teve o teor reduzido a 8,97±0,72% (Tabela 13). O presente estudo evidencia que a composição química da fração volátil varia significativamente com relação ao estágio de diferenciação da plântula.

Segundo informações encontradas na literatura (HÄNSEL et al., 1992), folhas jovens contêm mais monoterpenos em alto estado de oxidação e folhas mais velhas apresentam monoterpenos com baixo estado de oxidação, como o mentol. Essas informações se confirmam com os dados desse estudo, já que até aos 40 dias as folhas jovens acumularam pulegona, que é o precursor do mentol, e folhas mais velhas acumularam elevados teores de mentol.

Gershenzon et al. (2000) avaliando a produção de monoterpenos em *Mentha x piperita* observaram que durante o desenvolvimento das folhas, o conteúdo total de monoterpenos aumenta com a idade e a sua composição é significativamente alterada, tendo o limoneno e mentona como monoterpenos majoritários de folhas jovens, sendo que a proporção de limoneno diminui rapidamente com o desenvolvimento. Enquanto que a mentona torna-se proeminente e declina somente nos estágios tardios, quando o mentol torna-se o monoterpeno dominante (aos 55 dias de idade). A pulegona diminui com o aumento da mentona e posteriormente com a dominância do mentol.

Os dados evidenciam que quanto maior o tempo de cultivo, maior o acúmulo de mentol, composto de maior interesse das espécies de *Mentha*, como esses teores apresentaram comportamento crescente, é possível que quanto mais passasse o tempo, maiores também seriam os teores, porém deve-se atentar para as variáveis de crescimento, para que estas não sejam prejudicadas pelo tempo de permanência da plântula *in vitro*.

A biossíntese e o acúmulo do óleo resultam de uma complexa integração de diferentes rotas metabólicas, que requer contínua produção de precursores, seu transporte e translocação para o sítio ativo de síntese (SRIVASTAVA et al., 2003), e como mostra os resultados, a síntese dos constituintes voláteis é alterada com o crescimento da plântula, que acumula diferentes constituintes químicos dependendo da idade.

3.6 Produção de constituintes voláteis na planta matriz, plântula *in vitro* e aclimatizada

Na Tabela 14 estão listados por ordem de eluição 18 constituintes químicos detectados na composição da fração volátil das folhas nas diferentes condições de cultivo, os quais representam mais de 95% da fração volátil. O perfil químico da planta matriz variou tanto da plântula *in vitro* quanto da aclimatizada, porém com relação aos majoritários pulegona e mentol, a matriz e a aclimatizada apresentam valores próximos.

Os resultados indicam que as plântulas *in vitro*, até o período de avaliação (40 dias) tendem a acumular pulegona ao invés do mentol, porém após aclimatização passa a acumular mentol, dados que corroboram com Phatak e Heble (2002), os quais demonstraram que plântulas micropropagadas de *M. arvensis* acumularam pulegona (80%) como principal constituinte ao invés de mentol. No entanto, após aclimatização sintetizaram altas concentrações de mentol (86%) e baixas concentrações de pulegona (18%).

Como previsto, a planta matriz apresentou elevados teores de mentol ($78,88 \pm 0,10\%$), porém no cultivo *in vitro* o teor do mesmo composto foi drasticamente reduzido a $13,03 \pm 5,00\%$, tendo os valores aumentados nas plantas aclimatizadas ($67,48 \pm 2,05\%$). O inverso aconteceu com a pulegona que apresentou baixos teores na matriz e na aclimatizada, $0,37 \pm 0,00\%$ e $0,88 \pm 0,01$ respectivamente, e teor elevado nas folhas da plântula *in vitro* ($70,96 \pm 5,21\%$). Croteau et al. (2000) afirmam que na rota metabólica a pulegona pode formar mentona, que por sua vez forma neo-mentol e mentol, isso explica a redução da queda de pulegona quando os teores de mentol estão elevados.

Das diferenças qualitativas, o α -pineno e a iso-pulegona foram apenas detectados com baixos teores nas plântulas micropropagadas, $0,48 \pm 0,06\%$ e $0,29 \pm 0,01\%$ respectivamente.

Tabela 14 Constituição química da fração volátil de folhas da planta matriz, de plântulas *in vitro* e de aclimatizadas de *M. arvensis*. UFLA, Lavras, MG, 2013.

COMPOSTOS	IR ^a	Matriz	<i>In vitro</i>	Aclimatizada
		Área%±DP	Área%±DP	Área%±DP
α-pineno	1035	nd	0,48±0,06	nd
β-pineno	1129	0,66±0,02	1,12±0,10	0,79±0,00
sabineno	1135	0,41±0,02	0,56±0,06	0,44±0,01
mirreno	1165	0,52±0,02	0,64±0,09	0,64±0,01
limoneno	1216	2,04±0,03	1,60±0,71	5,32±0,69
1,8-cineol	1229	0,16±0,00	0,17±0,02	0,18±0,00
3-octanol	1398	0,72±0,05	tr	0,56±0,03
mentona	1477	6,04±0,12	2,65±0,73	13,74±1,28
mentofurano	1494	0,20±0,01	0,23±0,00	0,25±0,01
<i>iso</i> -mentona	1506	2,21±0,02	0,27±0,07	2,26±0,02
linalol	1547	0,45±0,02	0,44±0,04	0,41±0,02
<i>iso</i> -pulegol	1579	0,30±0,00	2,12±0,00	0,23±0,01
<i>iso</i> -pulegona	1593	nd	0,29±0,01	nd
E-cariofileno	1605	3,14±0,08	0,56±0,11	2,60±0,02
mentol	1642	78,88±0,10	13,03±5,00	67,48±2,05
pulegona	1649	0,37±0,00	70,96±5,21	0,88±0,01
p-ment-1-en-ol	1703	0,18±0,00	0,14±0,01	0,18±0,01
germacreno D	1711	0,58±0,02	0,18±0,04	0,62±0,03
Total identificado (%)		96,85	95,44	96,58
Número de compostos		16	18	16

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna DB-WAX.

DP: desvio padrão ($n = 2$). nd = não detectado; tr = traço ($\leq 0,01\%$).

4 CONCLUSÃO

Para o crescimento e produção de constituintes voláteis de *M. arvensis in vitro* o meio básico MS suplementado com BAP é o mais indicado, podendo a planta permanecer por até 100 dias em um mesmo meio de cultura, sendo o segmento nodal inoculado na horizontal o que proporciona melhor crescimento dos explantes. Nas condições experimentais testadas, a pulegona é o constituinte mais abundante, porém quanto maior o tempo no cultivo *in vitro*, maior o acúmulo de mentol. Plântulas *in vitro* de *M. arvensis* tendem a acumular pulegona, mas após a aclimatização, a planta acumula teores de mentol elevados próximos ao da planta matriz.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. 2007. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. London: Allured Pub. Corp. 804p.

ALI, A.; AFRASIAB, H.; SAEED, M.; IQBAL, J. An *in vitro* study of regeneration and micropropagation of *Mentha arvensis*. **International Journal of Biology and Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 519-528, 2004.

ARRIGONI-BLANK, M. de F.; COSTA, A. S.; FONSECA, V. O.; ALVES, P. B. e BLANK A. F. Micropropagação, aclimatização, teor e composição química do óleo essencial de genótipos de hortelã japonesa. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 1, p. 175-184, 2011.

BARREIRO, A. P.; ZUCARELI, V.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Análise de crescimento de plantas de manjeriço tratadas com reguladores vegetais. **Bragantia**, v. 65, n. 4, p. 563-567, 2006.

BERTONI, B. W.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MORO, J. R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.

BONA, C. M. de; BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C.; REINHART, V. Enraizamento *in vitro* de *Lavandula angustifolia*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 3-4, p. 401-404, 2011.

CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M. K.; BHOJWANI, S. S. *In vitro* clonal propagation of an adult tree of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) by forced axillary branching. **Plant Science**, v. 166, n. 2, p. 501-506, 2004.

CHISHTI, N.; SHAW, A. S.; KALOO, Z. A.; BHAT, M. A.; SULTAN, P. Clonal propagation of *Mentha arvensis* L. through nodal explant. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, n.9, p. 1416-1419, 2006.

COSTA, A. S. 2006. **Sustentabilidade da produção de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): micropropagação visando a conservação *in vitro***. Aracaju: UFS, 2006. 56p. (Dissertação- Mestrado em Agroecossistemas).

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 68-72, 2007.

COUTO, M.; OLIVEIRA, R. P.; FORTES, G. R. L. de. Multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* sp. cv. Barrier e Cadman. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 5-7, 2004.

CROTEAU, R. B., DAVIS, E. M., RINGER, K. L.; WILDUNG, M. R. Menthol biosynthesis and molecular genetics. **Naturwissenschaften**, v. 92, p. 562-577, 2005.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. (Eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318.

DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, v. 503, n. 1, p. 1-24, 1990.

DAVIS, E. M.; RINGER, K. L.; MCCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. Monoterpene metabolism. cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. **Plant Physiology**, v. 137, p. 873-881, 2005.

DINIZ, J. D. N.; MAGALHÃES, J. R.; INNECCO, R.; ALMEIDA, J. L.; PINHO, J. L. N. de. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do guaco. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2006.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 293-295, 2002.

FAQUIM, R., SILVA, I. D.; CARVALHO, R. I. N. Necessidade de frio para quebra de dormência de gemas de caqui 'Fuyu'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 438-444, 2007.

FERREIRA, D. F. SISVAR Versão 5.0. Departamento de Ciências Exatas. UFLA, Lavras, MG, 2007.

FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v. 36, p. 845-51, 2006.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GARLET, T. M. B.; SANTOS, O. S.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; GARCIA, D. C.; BORCIONI, E.; FLEIG, V. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 956-962, 2007.

GARLET, T. M. B.; FLORES, R.; MESSCHMIDT, A. A. Influência de citocininas na micropropagação de *Mentha x gracilis* Sole. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 30-34, 2011.

GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v. 122, p. 205-213, 2000.

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**, v. 51, n. 8, p. 2260-2266, 2003.

GONDIM, A. R. de O.; PRADO, R. de M.; CORREIA, M. A. R.; ALVES, A, U.; CECÍLIO FILHO, A. B.; POLITI, L. S. Curva de crescimento e acúmulo de matéria seca em couve-flor cultivada em substrato **Biosci. J.**, v. 27, n. 1, p. 88-94, 2011.

HÄNSEL, R.; KELLER, K.; RIMPLER, H.; SCHNEIDER, G. **Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis**, vol. 4., Berlin: Springer. p 821-848. 1992.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. C. S.; GONÇALVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea bianchetiana*. **Hoehnea**, v. 34, n. 1, p. 59-66, 2007.

KUMAR, S.; BAHL, J. R.; BANSAL, R. P.; GUPTA, A. K.; SINGH, V.; SHARMA, S. High economic returns from companion and relay cropping of bread wheat and menthol mint in the winter-summer season in north Indian plains. **Industrial Crops and Products**, v. 15, p. 103-114, 2002.

LLOYD, G.; McCROWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Proceedings-International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1980.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14481-14486, 2003.

MORAIS; L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-97, 1962.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version of the NIST/EPA/NIH mass spectral database**: software. Gaithersburg, 2008.

NISHIMURA, C.; OHASHI, Y.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; UEGUCHI, C. Histidine kinase homologs that acts as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 16, p. 1365-1377, 2004.

PASQUAL, M. 2001. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 74 p.

PAULUS, D.; MEDEIROS, S. L. P.; SANTOS, O. S.; MANFRON P. A.; PAULUS, E.; FABBRIN, E. Teor e qualidade do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) produzida sob cultivo hidropônico e em solo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 80-87, 2007.

PEREIRA, R. de C. ALVES; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CASTRO, E. M. de; SILVA, F. G. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) *Gmelin rubiaceae* (unha-de-gato). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 637-642, 2006.

PHATAK V. S.; HEBLE M. R. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 32-39; 2002.

PINTO, J. E. B.; LAMEIRA, O. A. 2001. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 101p.

POOVAIAH, C. R.; WELLER, S. C.; JENKS, M. A. Adventitious shoot regeneration of scotch spearmint (*Mentha x gracilis* Sole) *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.42, p.354-8, 2006.

RIBEIRO, M. de F.; DONINI, L.; P. SOUZA, J. A.; GUISSO, A. P.; FERREIRA-MOURA, I.; BOBROWSKI, V. L.; VIÉGAS, J. Influência de diferentes concentrações de sais de MS e açúcares no cultivo *in vitro* de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 57-59, 2007.

ROSSI, Z. T. T.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MONFORT, L. E. F.; MOREIRA, C. M. Crescimento *in vitro* de hortelã-japonesa em função de diferentes concentrações de sais, número e tipo de explante. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 54, N. 3, p. 267-273, 2011.

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**, v. 16, n. 6, p. 1387-1390, 2005.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SOUZA, W. P.; QUEIROGA C. L. ; SARTORATTO, A.; HONÓRIO, S. L. Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* (L.) Huds durante o período diurno em cultivo hidropônico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p.108-11, 2006.

SRIVASTAVA, N. K.; MISRA, A.; SHARMA, S. Variation among commercial cultivars of japanese mint (*Mentha arvensis* L.) in the morphological and metabolite characteres associated with essential oil yield. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 154-60, 2003.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TURNER, G. W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v. 124, p. 655-663, 2000.

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

WANG, X.; GAO, Z.; WANG, Y.; BRESSAN, R. A. ; WELLER, S. C.; LI, X. Highly efficient *in vitro* adventitious shoot regeneration of peppermint (*Mentha x piperita* L.) using internodal explantes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 45, p. 435-440, 2008.